

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**Modulación mediante preconditionamiento
anestésico con sevoflurano de la respuesta
inflamatoria y apoptótica inducida por isquemia-
reperfusión en un modelo experimental porcino
de autotrasplante pulmonar**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Uxío García Aldao

DIRECTORES

Emilio Álvarez Fernández
María Cebollero Presmanes
Ignacio Garutti Martínez

Madrid, 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía Patológica



Modulación mediante preconditionamiento anestésico con sevoflurano de la respuesta inflamatoria y apoptótica inducida por isquemia-reperfusión en un modelo experimental porcino de autotrasplante pulmonar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Uxío García Aldao

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

**Emilio Álvarez Fernández
María Cebollero Presmanes
Ignacio Garutti Martínez**

Madrid, 2017

Á miña nai

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

Al Prof. Emilio Álvarez Fernández, Profesor Emérito de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid que, como jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón durante el tiempo que se realizó este trabajo, me ofreció la posibilidad de involucrarme en este proyecto y me dirigió con sus sabios consejos.

A la Prof. María Cebollero Presmanes, Profesora Asociada Doctora del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid, por su paciencia y colaboración en mi aproximación al mundo apasionante de la Anatomía Patológica.

Al Prof. Ignacio Garutti Martínez, Profesor Asociado Doctor del Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid, por contar conmigo para este proyecto y ayudarme a adentrarme en el método científico.

Al Prof. Carlos Simón Adiego, Profesor Asociado Doctor de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid, por su apoyo incansable y preocupación por mí, profesional y personal. Un amigo al que nunca podré agradecer suficientemente.

Al Prof. Francisco Javier Carricondo Orejana, Profesor Contratado Doctor, a la Prof. Bárbara Romero Gómez, Profesora Asociada, y a Encarnación Muñoz Ferrero, Técnico, del Laboratorio de Neurobiología de la Audición de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Un gran equipo que nos brindó sus instalaciones y conocimientos, sin los que nunca lo habríamos conseguido.

Al personal técnico del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, especialmente a Marisa Herranz Aladro y Julio García Bordás.

A todos los colaboradores en la realización de experimentos, personal de los Servicios de Cirugía Torácica, Anestesia y Reanimación y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, sin los cuales este trabajo habría sido imposible.

A la Prof. Elena Vara Ameigeiras, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su inestimable apoyo.

A mis amigas Sara Zapatero García y Andrea Romera Rabasa, las mejores compañeras de viaje que se podría imaginar, con las que a lo largo estos años he vivido algunas situaciones que, sin duda, nos han hecho amigos para siempre.

A mi querida compañera Estrella Terradillos Martín, adjunta del Servicio de Anestesia y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por su apoyo en los momentos más difíciles, fundamental para poder seguir adelante.

Uno empieza realmente a entender, cuando tiene hijos, lo que sienten por él sus padres. A ellos, referencia constante, y a mi querida hermana María. Todo lo que soy se lo debo a ellos.

Por último, quiero agradecer a mi mujer Marta, la mejor persona y la mejor madre que podría imaginar a mi lado. Sin su ayuda y paciencia nunca habría podido llegar hasta aquí. Y a mis hijos Mateo, Marta y María. Sé que su sacrificio en los últimos meses ha sido superior al mío. Sin vosotros mi vida no tendría sentido.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ALI – Daño pulmonar agudo, del inglés *acute lung injury*

ATP – Adenosín trifosfato

APAF-1 – Factor activador de las proteasas apoptogénicas - 1

Bcl-2 – Célula B del linfoma - 2

cGMP – Guanosín monofosfato cíclico

CON – Grupo control

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FC – Frecuencia cardíaca

IC – Índice cardíaco

ICAM-1 – Molécula de adhesión intracelular - 1

IFN γ – Interferón gamma

IL-1 – Interleuquina 1

IL-1 α – Interleuquina 1 alfa

IL-1 β – Interleuquina 1 beta

IL-6 – Interleuquina 6

IL-8 – Interleuquina 8

IL-10 – Interleuquina 10

IR – Isquemia-reperfusión

LIRI – Daño pulmonar por isquemia-reperfusión (del inglés *lung ischemia reperfusion injury*)

LT – Linfocitos T

MA – Macrófagos alveolares

MCP-1 – Proteína quimioatrayente de monocitos - 1

MM – Monocito/Macrófago

mRNA – RNA mensajero

NADPH – Nicotinamida adenina nucleótido fosfato

NFκB – Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK – Linfocitos natural killers

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetasa

O₂ – Oxígeno

PAF – Factor activador de plaquetas

PAM – Presión arterial media

PaCO₂ – Presión arterial de dióxido de carbono

PaO₂ – Presión arterial de oxígeno

PCP – Presión capilar pulmonar

PMN – Polimorfonucleares

PosR – Posreperusión

PreR – Prerreperusión

ROS – Radicales libres de oxígeno

SEVO – Grupo sevoflurano

SHAM – Grupo sham de cirugía simulada

TNFα – Factor de necrosis tumoral α

ÍNDICE

1	RESUMEN / SUMMARY	1
2	INTRODUCCIÓN	10
2.1	Síndrome isquemia-reperfusión	11
2.2	Síndrome isquemia-reperfusión pulmonar	12
2.3	Mecanismos de daño pulmonar	15
2.3.1	Estrés oxidativo	15
2.3.2	Metabolismo del óxido nítrico	16
2.3.3	Mediadores celulares	16
2.3.3.1	Macrófagos	17
2.3.3.2	Neutrófilos	18
2.3.3.3	Linfocitos T y Natural Killers	19
2.3.3.4	Células endoteliales	19
2.3.3.5	Células epiteliales alveolares	20
2.3.4	Mediadores moleculares: citoquinas y factores quimiotácticos	20
2.3.4.1	Citoquinas y quimioquinas	20
2.3.4.2	Otros mediadores	23
2.3.5	Muerte celular: necrosis y apoptosis	23
2.3.5.1	Introducción	23
2.3.5.2	Ejecución de la apoptosis: las caspasas	25
2.3.5.3	Vías de la apoptosis	26
2.3.5.4	Papel de las proteínas de la familia Bcl-2	27
2.4	Estrategias de prevención del daño por isquemia-reperfusión pulmonar	28
2.5	Modulación del daño por isquemia-reperfusión pulmonar mediante precondicionamiento anestésico	30
2.5.1	Sevoflurano	30

2.5.2	Precondicionamiento anestésico con sevoflurano	31
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
3.1	Hipótesis	36
3.2	Objetivos	36
4	MATERIAL Y MÉTODOS	38
4.1	Resumen	39
4.2	Material y métodos	39
4.2.1	Instalaciones	39
4.2.2	Material biológico: animales	40
4.2.3	Material quirúrgico y anestésico	41
4.2.4	Monitorización y técnica anestésica	42
4.2.5	Protocolo quirúrgico	45
4.2.6	Diseño experimental	46
4.2.7	Momentos de medición y toma de muestras	47
4.2.8	Obtención y preparación de las muestras	49
4.2.9	Variables estudiadas	50
4.2.10	Procesamiento de las muestras de tejido pulmonar	50
4.2.10.1	Tinción hematoxilina-eosina	50
4.2.10.2	Técnicas inmunohistoquímicas	53
4.2.11	Análisis de datos y tratamiento estadístico	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Variables generales	60
5.2	Variables hemodinámicas	60
5.3	Variables gasométricas	64

5.4	Determinación histopatológica de mediadores de daño pulmonar	67
5.4.1	Tinción con hematoxilina-eosina	67
5.4.1.1	Estudio descriptivo	67
5.4.1.2	Análisis semicuantitativo	74
5.4.2	Técnicas inmunohistoquímicas	76
5.4.2.1	Presencia de macrófagos (CD-68)	76
5.4.2.1.1	Estudio descriptivo	76
5.4.2.1.2	Análisis cuantitativo	81
5.4.2.2	MCP-1	82
5.4.2.2.1	Estudio descriptivo	82
5.4.2.2.2	Análisis cuantitativo	85
5.4.2.3	Caspasa 9	87
5.4.2.3.1	Estudio descriptivo	87
5.4.2.3.2	Análisis semicuantitativo	90
5.4.2.4	BCL-2	91
5.4.2.4.1	Estudio descriptivo	91
5.4.2.4.2	Análisis cuantitativo	94
6	DISCUSIÓN	96
6.1	Efectos hemodinámicos del sevoflurano	101
6.2	Efectos del sevoflurano sobre la oxigenación y el intercambio gaseoso	103
6.3	Efecto del sevoflurano sobre el reclutamiento de monocitos/macrófagos	105
6.4	Efecto del sevoflurano sobre la expresión de MCP-1	110
6.5	Efecto del sevoflurano sobre la expresión de caspasa 9 y Bcl-2	113
7	CONCLUSIONES	122
8	BIBLIOGRAFÍA	125

1 RESUMEN / SUMMARY

INTRODUCCIÓN

La isquemia forma parte de la fisiopatología de numerosos eventos que tienen lugar de forma habitual en nuestro ámbito. Para evitar el daño celular irreversible resulta esencial el restablecimiento precoz de la circulación. Pero es durante la restauración del flujo sanguíneo cuando se producen la mayoría de las lesiones. Este fenómeno es conocido como lesión por isquemia-reperfusión (IR). Cuando tiene lugar en el pulmón, se conoce como LIRI (*lung ischemia-reperfusion injury*) y es una de las complicaciones más importantes tras el trasplante pulmonar. Tanto la isquemia como la perfusión juegan papeles importantes, aunque mediante diferentes vías. Los mecanismos patológicos incluyen la activación de neutrófilos y la liberación de múltiples mediadores proinflamatorios. La liberación de radicales libres de oxígeno (ROS) es fundamental para la instauración del daño celular, la necrosis y apoptosis de células neumocitarias. A nivel pulmonar, surgen cada vez más estudios que demuestran los efectos protectores del isoflurano, el halotano y sevoflurano en modelos experimentales de daño pulmonar agudo (ALI). El sevoflurano es el gas anestésico halogenado usado más frecuentemente en nuestro medio. En los últimos años se han demostrado sus propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas en el ámbito de la IR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis. La administración de sevoflurano al donante, en un trasplante pulmonar, podría disminuir la respuesta inflamatoria y apoptótica del

pulmón trasplantado, observándose desde los primeros momentos de la perfusión pulmonar en estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

Objetivos. Estudiar los efectos precoces, histológicos e inmunohistoquímicos, de la IR pulmonar en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar porcino, analizando los efectos del preconditionamiento con sevoflurano. Para ello se estudiarán los cambios morfológicos y los efectos del sevoflurano; la respuesta inflamatoria mediante la infiltración de monocitos/macrófagos (MM); la expresión inmunohistoquímica de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y su relación con la infiltración monocito/macrófaga; y la respuesta apoptótica y el preconditionamiento con sevoflurano mediante inmunohistoquímica que detecte la expresión de Caspasa 9 o Bcl-2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realiza en un modelo de IR pulmonar, un autotrasplante pulmonar porcino. El experimento se realizó en 16 cerdos de la raza Large White, divididos en tres grupos: control (CON, n = 6) al que se le realizó el protocolo quirúrgico, con mantenimiento anestésico con propofol en perfusión durante todo el procedimiento; preconditionamiento con sevoflurano (SEVO, n = 6) con el mismo protocolo quirúrgico, pero se le administró sevoflurano al 3% hasta iniciar la ventilación unipulmonar; y sham (SHAM, n = 4) con técnica anestésica igual al grupo control, pero realizándose solo una toracotomía. El procedimiento quirúrgico concluye a los 30 minutos de reperfundir el lóbulo pulmonar implantado, momento en que se realizan biopsias. Se registraron variables hemodinámicas y gasométricas. Se realizan estudios

histológicos e inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para determinar la actividad inflamatoria mediante infiltración de MM (CD68) y expresión de MCP-1, así como actividad apoptótica mediante expresión de caspasa 9 y Bcl-2. Se estudia el posible efecto protector del preconditionamiento anestésico con sevoflurano.

En el estudio analítico de los datos clínicos y de laboratorio, se realizó el test de Kruskal-Wallis para identificar las diferencias significativas entre los grupos, usando la prueba de la U de Mann-Whitney cuando se encontraron diferencias significativas.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en las variables generales y gasométricas. En cuanto a las hemodinámicas, en el grupo sevoflurano se encontró una disminución de la presión arterial media en la medición basal con respecto al grupo sham (SEVO vs SHAM, $p=0,01$) y control (SEVO vs CON, $p=0,004$). Y un aumento de las presiones capilares pulmonares en el momento pre-reperfusión con respecto al grupo sham en los grupos control (SHAM vs CON, $p=0,01$) y sevoflurano (SHAM vs SEVO, $p=0,01$). Tras la reperfusión, la presión capilar pulmonar en el grupo sevoflurano fue menor que en el grupo control (SEVO vs CON, $p=0,01$).

No se observaron diferencias entre grupos respecto al inflamación o infiltración por linfocitos o leucocitos. La IR pulmonar aumentó la infiltración de MM tras la reperfusión en el grupo control, (CON vs SHAM, $p=0,021$). Esta fue menor en los pulmones sometidos a preconditionamiento (SEVO vs CON, $p=0,014$).

En el grupo control se observó un aumento de la expresión de CD68 con respecto al grupo sham (CON vs SHAM, $p=0,011$), igual que en el grupo sevoflurano (SEVO vs SHAM, $p=0,008$). Pero esta elevación fue significativamente menor en el grupo sevoflurano (CON vs SEVO, $p=0,01$). El MCP-1 aumentó su expresión en el grupo control con respecto al sham (CON vs SHAM, $p=0,013$). Esta elevación fue significativamente menor en el grupo sevoflurano (CON vs SEVO, $p=0,028$). La caspasa 9 aumentó su expresión en el grupo control (CON vs SHAM, $p=0,005$). Este aumento fue menor en el grupo sevoflurano (SEVO vs CON, $p=0,018$). En el análisis cuantitativo de la expresión inmunohistoquímica de Bcl-2, en el grupo sevoflurano se observó un aumento con respecto al grupo control (CON vs SEVO, $p=0,007$). Lo mismo se observó en el grupo sevoflurano con respecto al grupo sham (SEVO vs SHAM, $p=0,018$).

CONCLUSIONES

En este modelo de autotrasplante pulmonar, la IR induce, a los 30 minutos de la reperusión, la infiltración del tejido pulmonar por MM. Se ha observado, mediante inmunohistoquímica, el aumento de la inflamación a través de la expresión de CD68 y MCP-1, así como un aumento de la actividad apoptótica mediante el aumento de la expresión de caspasa 9 y disminución de Bcl-2. El preconditionamiento anestésico con sevoflurano consiguió modular la respuesta inflamatoria, disminuyendo la expresión de CD68 y MCP-1, y la respuesta apoptótica, disminuyendo la expresión de caspasa 9 y aumentando la de Bcl-2.

INTRODUCTION

Ischemia is part of the physiopathology of several events that happen regularly in our field. In order to avoid irreversible cell damage, early circulation reestablishment is essential. However, it is during this bloodstream restoration when most injuries occur. This phenomenon is known as ischemia-reperfusion injury (IR). When it takes place in the lung, it is known as lung IR injury (LIRI) and it is one of the most important complications after lung transplantation. Both ischemia and reperfusion play important roles, even if through different paths. Pathological mechanisms include the activation of neutrophils and the release of multiple proinflammatory mediators. The release of oxygen free radicals (ROS) is essential for the establishment of cell damage, pneumocyte cells necrosis and apoptosis.

At lung level, there are even more studies that demonstrate the protective effects of isoflurane, halothane and sevoflurane in experimental models of acute lung injury (ALI). Sevoflurane is the most commonly used halogenated anesthetic gas in our field. In the past years, it has been proven to have anti-inflammatory and antiapoptotic properties in the IR.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Hypothesis. Sevoflurane administration to the donor in a lung transplant could reduce the inflammatory and apoptotic response of the transplanted lung, and this can be seen from the initial stages of lung reperfusion in histological and immunohistochemical studies.

Objectives. The aim of this study is to examine the early, histological and immunohistochemical effects of lung ischemia-reperfusion in an experimental model of porcine lung autotransplantation, by analyzing the effect of preconditioning with sevoflurane. For this purpose, we will study the morphological changes and effects of sevoflurane; the inflammatory response through monocyte/macrophage infiltration; the immunohistochemical expression of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its relation with monocyte/macrophage infiltration; and the apoptotic response and preconditioning with sevoflurane through detection of immunohistochemical expression of Caspase-9 and Bcl-2.

MATERIAL AND METHODS

This study is performed in a porcine lung autotransplantation and lung IR model. The experiment was conducted in 16 Large White pigs, divided into three groups: control (CON, n=6), which underwent surgical protocol with propofol infusion for maintenance of anesthesia throughout the whole procedure; preconditioning with sevoflurane (SEVO, n=6) undergoing the same surgical protocol, but adding 3% sevoflurane until one-lung ventilation initiation; and sham (SHAM, n=4), with the same anesthetic technique as in the control group, but performing only a thoracotomy. The surgical procedure ends 30 minutes after reperfusion of the reimplanted lung lobe, time at which biopsies are performed. Hemodynamic and gasometric variables were measured. Histological and immunohistochemical studies are performed with specific antibodies in order to identify the inflammatory activity through monocyte/macrophage infiltration (CD68) and MCP-1 expression, as well as apoptotic activity

through Caspase-9 and Bcl-2 expression. We study the possible protective effect of anesthetic preconditioning with sevoflurane.

Clinical and laboratory data were analyzed with the Kruskal-Wallis test in order to identify the significant differences between groups. Mann-Whitney U test was used when significant differences were found.

RESULTS

No significant differences were found in the general and gasometric variables. Regarding the hemodynamic variables, the sevoflurane group faced a reduction in average blood pressure in basal measurements compared to the sham (SEVO vs SHAM, $p=0.01$) and control (SEVO vs CON, $p=0.004$) groups. An increase in the lung capillary pressures at the time of pre-reperfusion was also seen in the sevoflurane group (SEVO vs SHAM, $p=0.01$) and the control group (CON vs SHAM, $p=0.01$) compared to the sham group. After reperfusion, lung capillary pressure in the sevoflurane group was lower than in the control group (SEVO vs CON, $p=0.01$).

No significant differences were observed between groups regarding inflammation or lymphocyte-leukocyte infiltration. LIRI increased the monocyte/macrophage infiltration after reperfusion in the control group (CON vs. SHAM, $p=0.021$), and it was lower in the lungs subjected to preconditioning (SEVO vs. CON, $p=0.014$).

The control group showed an increase in CD68 expression compared to the sham group (CON vs. SHAM, $p=0.011$), as was the case with the sevoflurane group (SEVO vs. SHAM, $p=0.008$). However, this

increase was significantly lower in the sevoflurane group (CON vs. SEVO, $p=0.01$).

MCP-1 expression was increased in the control group compared to sham group (CON vs. SHAM, $p=0.013$). This increase was significantly lower in the sevoflurane group (CON vs. SEVO, $p=0.028$).

Caspase-9 expression was increased in the control group (CON vs. SHAM, $p=0.005$). This increase was lower in the sevoflurane group (SEVO vs. CON, $p=0.018$).

The quantitative analysis of immunohistochemical expression of Bcl-2 in the sevoflurane group showed an increase compared to the control group (CON vs. SEVO, $p=0.007$). This was also observed in the sevoflurane group compared to the sham group (SEVO vs. SHAM, $p=0.018$).

CONCLUSIONS

In this lung autotransplantation model, IR leads to monocyte/macrophage infiltration of the lung tissue 30 minutes after reperfusion. By means of immunohistochemistry, we have managed to observe an increase in inflammation through CD68 and MCP-1 expression, as well as an increase in apoptotic activity through the increase of Caspase-9 expression and a reduction of that of Bcl-2. Sevoflurane anesthetic preconditioning managed to modulate inflammatory response by reducing CD68 and MCP-1 expression, as well as the apoptotic response by reducing Caspase-9 expression and increasing that of Bcl-2.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Síndrome isquemia-reperfusión

La disminución del aporte de riego sanguíneo a un tejido, la isquemia, forma parte de la fisiopatología de numerosos eventos que tienen lugar de forma habitual en nuestro ámbito; el infarto de miocardio, el accidente vascular cerebral, la insuficiencia vascular periférica, el shock... En múltiples procedimientos quirúrgicos como el trasplante de órganos, traumatológicos, *bypass* aórtico, cardiopulmonar, hepatectomía o angioplastia coronaria, es imprescindible la instauración de un periodo de isquemia a un determinado órgano o región anatómica. Sabemos que para evitar el daño celular irreversible causado por la isquemia resulta esencial el restablecimiento precoz de la circulación. Sin embargo, es durante la restauración del flujo sanguíneo cuando se producen la mayoría de las lesiones, potenciando aquellas que ya se habían iniciado durante el periodo de isquemia mediante la activación de una cascada de acontecimientos que abordaremos en detalle. Este fenómeno, conocido como **lesión por isquemia-reperfusión (IR)** (1), no solo tiene lugar a nivel local, sino también a nivel sistémico, pudiendo afectar de manera indirecta a órganos que no han sido sometidos a isquemia.

En la IR se suceden diversos cambios metabólicos a nivel celular y molecular. La isquemia prolongada resulta en una disminución en la fosforilación oxidativa, lo que dificulta la síntesis de fosfatos como el ATP, fundamental en la obtención de energía celular. El deterioro de la función de la bomba iónica ATP-dependiente produce la entrada de sodio, calcio y agua en la célula y la salida de potasio. El catabolismo de los nucleótidos de adenina resulta en la acumulación intracelular de hipoxantina, que tras

la reperfusión –en presencia de oxígeno- dará lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstas no solo producen daño celular directo, si no que aumentan la activación leucocitaria, la quimiotaxis y la adherencia leucocito-endotelial. En el endotelio la isquemia induce la expresión de material genético proinflamatorio y agentes bioactivos, al tiempo que se inhibe la expresión de otros agentes con función protectora. Las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la localización del tejido y su grado de afectación. A nivel sistémico, la acidosis metabólica y la hipercaliemia, si no se compensan, pueden conducir a la muerte del individuo. Aparecen mioglobinemia, mioglobinuria y en el pulmón aumenta la permeabilidad vascular y la acumulación de neutrófilos, pudiendo desarrollarse el denominado edema pulmonar no cardiogénico o pulmón de distrés (2-3).

2.2 Síndrome isquemia-reperfusión pulmonar

La lesión por isquemia-reperfusión, cuando tiene lugar en el pulmón, se conoce como **LIRI** (del inglés *lung ischemia-reperfusion injury*) (4). Se observa con frecuencia tras procedimientos como el *by-pass* cardiopulmonar, reanimaciones por parada cardíaca, embolia pulmonar o trauma torácico. En el trasplante pulmonar se relaciona con fallos del injerto hasta en un 15% de los casos, llevando a un fallo de injerto primario en hasta un 20% de los trasplantes pulmonares en los primeros 90 días, y constituyendo una causa importante de morbilidad posttrasplante por producir daño pulmonar agudo (ALI) y/o síndrome de distrés respiratorio del adulto (5). El LIRI es un fenómeno complejo en el

que tienen lugar diversas alteraciones a nivel fisiológico, bioquímico e histológico. A **nivel fisiológico** se produce un aumento de la permeabilidad pulmonar –aumentando hasta 10 veces- y resistencia vascular pulmonar y alteraciones de intercambio gaseoso secundarios al edema pulmonar. Los cambios en la microvascularización parecen seguir un patrón bimodal a los 30 minutos y 4 horas (6). La primera fase estaría más relacionada con la aparición de macrófagos pulmonares activados, quimioquinas, TNF α , IFN γ y MCP-1. Mientras que la fase tardía dependería más de productos de la activación de los neutrófilos y del TNF α . A **nivel bioquímico** los cambios detectados son aquellos relacionados de forma directa o indirecta con el daño (metaloproteinasas, mieloperoxidasas, activadores e inhibidores de plasminógeno...), productos asociados con o liberados del tejido pulmonar afectado (glutación...) y la reducción de sustancias normalmente sintetizadas en el pulmón (cGMP, óxido nítrico [NO], ATPasa...). Algunas enzimas proteolíticas liberadas de PMN activados, como las metaloproteasas y la mieloperoxidasa, son considerados ya marcadores clásicos de daño pulmonar. La producción normal de NO por la óxido nítrico sintasa (NOS, mediada por el segundo mensajero cGMP) depende de la integridad pulmonar del endotelio vascular y del epitelio pulmonar. Los niveles tisulares de cGMP y NOS se encuentran disminuidos tras la reperfusión en varios modelos de IR (7). Del mismo modo, los niveles de mRNA Na/K ATPasa y Na/K ATPasa aparecen alterados (enzima reguladora del edema en el LIRI) de forma bimodal, con un aumento y posterior disminución de sus niveles tisulares (8). A **nivel histológico** la respuesta

celular inicial se caracteriza por alteraciones morfológicas celulares, con aparición de células de morfología redondeada e hipercromatismo nuclear y contracción celular más que de lisis, parece que en relación con la entrada de Ca al interior de la célula que provoca contracción de la actina-miosina (9). Mediante microscopía óptica y electrónica, en muestras pulmonares de animales sometidos a IR y/o trasplante pulmonar, se observan cambios como edema intersticial alveolar, membranización hialina de los conductos alveolares, infiltrados PMN de los vasos pulmonares o desprendimiento de células endoteliales y neumocitos tipo II de la membrana basal.

FISIOPATOLOGÍA DEL LIRI

Primera fase de isquemia: Al interrumpirse el flujo de oxígeno al pulmón, el metabolismo pasa de aerobio a anaerobio. La hipoxia y la ausencia de mecanotransducción en arteriolas y capilares vasculares pulmonares inducen a macrófagos y células endoteliales principalmente a la producción de ROS (5). La producción de ROS en el pulmón activa la óxido nítrico sintetasa (NOS), el factor nuclear kB (NFkB), la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y algunas citoquinas proinflamatorias, lo que a su vez produce un aumento de las moléculas de adhesión de superficie celular, como la molécula de adhesión intracelular - 1 (ICAM-1).

Segunda fase o de reperusión: Una vez se restaura de nuevo el flujo sanguíneo, el aumento de ROS y citoquinas que ha tenido lugar durante la fase isquémica produce la activación de neutrófilos que, a su vez, junto con la activación de plaquetas y vías de señalización del NO,

resulta en lo que se denomina daño vascular inducido por IR. Es en esta fase cuando se producen la mayoría de las lesiones, potenciándose aquellas que se habían iniciado durante la isquemia (10-11). Clínicamente, este daño vascular se traduce en un aumento en la resistencia vascular pulmonar, permeabilidad vascular pulmonar y edema pulmonar, con alteraciones de la ventilación-perfusión que se hacen evidentes tras la reperfusión pulmonar.

2.3 Mecanismos de daño pulmonar

2.3.1 Estrés oxidativo

Consiste en la formación de ROS, pequeñas moléculas que se generan habitualmente como subproducto del metabolismo normal del oxígeno que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Algunos ejemplos importantes son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ROS tienen importantes funciones de señalización y homeostasis. Su inestabilidad hace que reaccionen fácilmente atacando los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. Esta reacción, denominada lipoperoxidación se propaga en cadena y provoca la fragmentación de la membrana celular y, con ello, graves alteraciones estructurales y funcionales de la membrana, que pueden finalizar en daño celular irreversible. La generación de ROS se ha demostrado en la mayoría de las células del parénquima pulmonar, incluyendo las endoteliales, neumocitos tipo II, células de Clara, ciliadas y

macrófagos alveolares (MA) (12). El desequilibrio entre la formación de ROS y la detoxificación y reparación de daños por parte de un sistema biológico, es lo que se denomina estrés oxidativo.

2.3.2 Metabolismo del óxido nítrico

Producido por varios tipos de células, como las endoteliales, cuando el aminoácido L-arginina es transformado por la enzima NOS. Juega un importante papel en la homeostasis vascular gracias a sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y vasoregulatoras. Ha demostrado su implicación en el control del aumento de flujo capilar y del daño tisular en modelos animales de LIRI e inhibe la adhesión de neutrófilos -y su producción de superóxidos- y la agregación plaquetaria. Tras el LIRI se produce un descenso en los niveles endógenos de NO y un aumento en la expresión de NOS endotelial provocado tanto por la reperfusión de ROS (y su reacción dando lugar a la formación de especies reactivas nitrogenadas o peroxinitritos) como por la producción de sustancias inhibitoras de NOS. Como consecuencia se produce una pérdida de la acción protectora del NO y con ella el daño endotelial (13).

2.3.3 Mediadores celulares

Como consecuencia del estrés oxidativo, se produce una activación de la cascada inflamatoria mediada por diversas células, tanto del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, células dendríticas...) como pulmonares (epitelio alveolar y endotelial). Los eventos que tienen lugar

en el desarrollo de la lesión posreperfusión parecen seguir un **comportamiento bifásico**. Los macrófagos parecen tener un papel predominante inmediatamente tras el inicio de la reperfusión. En cambio, los neutrófilos, muestran menos implicación en fases tempranas y centran su actividad en perpetuar el daño asociado a la reperfusión a partir de las 4 horas de reperfusión (14-15).

2.3.3.1 Macrófagos

Son células pertenecientes al sistema inmunitario que se localizan en los tejidos. Proceden de células precursoras de la médula ósea que al dividirse dan lugar a monocitos. Estos entran al tejido conectivo atravesando las paredes de los capilares, convirtiéndose en macrófagos. Los macrófagos son reguladores críticos en múltiples sistemas del organismo de la inmunidad innata y adquirida, el metabolismo sistémico, hematopoyesis, angiogénesis, malignidad y reproducción celulares. Se clasifican en dos tipos, M1 o proinflamatorios y M2 o antiinflamatorios (16). Los MA juegan un papel fundamental en la primera fase de la lesión IR, como ya se ha observado en algunos modelos animales cardíacos, hepáticos y pulmonares (17-19). En respuesta a la isquemia y al estrés oxidativo, el macrófago inicia la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, que a su vez potencia la liberación de otras citoquinas como el IFN γ , IL-6, IL-8, IL-10 o la MCP-1, modulando la quimiotaxis y activación de neutrófilos y linfocitos (6,20).

El CD68 es una glicoproteína intracelular presente en citoplasma y membranas de los macrófagos. Es el marcador de macrófagos más

usado en inmunohistoquímica, ya que su expresión se limita a monocitos y macrófagos tanto en pulmón como peritoneo y bazo. También se puede encontrar en células de Langerhans y microglía. Diferentes trabajos lo estudian para predecir el rechazo mediado por anticuerpos (21), valorar el ALI en ratón secundario a pancreatitis (22), mostrar la disminución del infiltrado de macrófagos en un modelo de LIRI en ratas con hipertensión pulmonar tras la administración de una estatina (23) o demostrar, mediante inmunofluorescencia, el beneficio del uso de células madre mesenquimales en un modelo de LIRI en ratas (24).

2.3.3.2 Neutrófilos

A pesar de la controversia en los últimos años, parece claro que, aunque la activación y reclutamiento de los neutrófilos se inicia durante la isquemia, constituye uno de los mecanismos principales de daño pulmonar en el LIRI en fases tardías (14-15). Es un proceso complejo del que forman parte múltiples mecanismos moleculares y celulares. Los macrófagos pulmonares y las células endoteliales dañadas liberan citoquinas proinflamatorias, aumentando el tropismo y activación de neutrófilos. Éstos últimos interactúan con el endotelio vascular primero mediante movimientos de rodamiento (unión intermitente o *rolling*), adherencia firme al endotelio y por último trans migración endotelial al intersticio. Al llegar al espacio extravascular, liberan grandes cantidades de ROS, proteasas y elastasas, amplificando el daño tisular. Las moléculas de adhesión o integrinas o las quimioquinas también juegan también un papel importante en el gradiente leucocitario. La MCP-1 fue la

primera en ser identificada, regulando la migración y activación de monocitos y macrófagos. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad microvascular pulmonar, el edema, la trombosis y, con éstos, la muerte celular del parénquima (25). El reclutamiento de neutrófilos ocurre tanto durante la fase de isquemia como de reperfusión, infiltrando el pulmón trasplantado característicamente durante las primeras 24h posreperfusión (26).

2.3.3.3 Linfocitos T y Natural Killers

Los linfocitos también tienen un papel importante en la IR. El pulmón en el trasplante contiene una gran cantidad de linfocitos activados, representados por LT y NK, responsables de la respuesta inmune injerto-huesped, pero también de algunos efectos inmunomoduladores beneficiosos.

2.3.3.4 Células endoteliales

El endotelio, implicado en diversas funciones de regulación de homeostasis, puede activarse tras ser expuesto a estímulos proinflamatorios, como la IL-1 y el $\text{TNF}\alpha$, producidas por macrófagos activados o las propias células endoteliales. Al activarse el endotelio, se desarrolla un estado proinflamatorio y protrombótico, aumentando a su vez la producción de citoquinas, NO, factores estimulantes de colonias, etc...

2.3.3.5 Células epiteliales alveolares

También en los neumocitos tipo II (encargados de la producción de surfactante y el intercambio de iones) se produce liberación de citoquinas inflamatorias y proteínas quimiotácticas, jugando un papel importante en el tropismo de neutrófilos al lugar de la inflamación. La rotura de la integridad del epitelio expone estructuras de la matriz extracelular, interaccionando con MA y aumentando la respuesta inflamatoria (27).

2.3.4 Mediadores moleculares: citoquinas y factores quimiotácticos

2.3.4.1 Citoquinas y quimioquinas

Las citoquinas y quimioquinas, secretadas por los MA, a su vez provocan un aumento en la producción de moléculas de adhesión, activación de las células endoteliales, disminución de la sensibilidad vascular de las células de músculo liso ante señales vasoactivas y promueven la llegada de leucocitos al lugar de inflamación. Los macrófagos son los productores iniciales de $\text{TNF}\alpha$ y los principales de MCP-1 en el pulmón (5).

IL-1 β . Las interleuquinas son un conjunto de proteínas solubles de bajo peso molecular, sintetizadas principalmente por los leucocitos. La IL-1,

formada por 153 aminoácidos, es producida por varios tipos celulares, principalmente macrófagos activados. Presente en casi todos los tejidos, los niveles mayores se encuentran en hígado, bazo y pulmón. Es liberada en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ y existe en dos formas: $\text{IL-1}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Entre las funciones de la $\text{IL-1}\beta$ destaca la activación de neutrófilos y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y células endoteliales. Induce la producción de diversos mediadores proinflamatorios como citoquinas y quimioquinas (IL-8 , MCP-1 ...) y se relaciona con la oclusión trombótica de la microcirculación pulmonar característica en el LIRI. La $\text{IL-1}\beta$ aumenta sus niveles durante la reperfusión, relacionándose con el grado de infiltración de neutrófilos, edema pulmonar y permeabilidad vascular, lo que da una idea de su importancia en el LIRI (28-29).

$\text{TNF}\alpha$. El $\text{TNF}\alpha$ se trata de una glicoproteína de 157 aminoácidos que procede de un propéptido de 212 aminoácidos. Secretada por numerosas células, principalmente monocitos y macrófagos, células T, NK y neutrófilos. Mediador de la inflamación local, tiene un importante rol en el sistema inmunitario del huésped, vital para mantener localizadas las infecciones (30). El $\text{TNF}\alpha$ es muy importante en el inicio del LIRI, siendo secretado a los pocos minutos del inicio de la reperfusión por MA que rápidamente comienzan a producirlo en respuesta al estrés oxidativo. Esto potencia la liberación de citoquinas, quimioquinas, recluta células

inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, activando el endotelio y liberando NO, lo que aumenta la permeabilidad vascular pulmonar y produce vasodilatación. Es el principal responsable de la modulación del proceso de migración leucocitaria hacia las zonas de inflamación, la adhesión y el paso de leucocitos a través del endotelio (31). Parece que además podría inducir a las células epiteliales alveolares a la producción de otras citoquinas inflamatorias, lo que aumentaría la llamada de neutrófilos al lugar de la lesión, agravándola (32).

MCP-1. Las quimioquinas son un tipo de citoquinas quimiotácticas que se clasifican en cuatro familias en función del número y la situación de los residuos de cisteína en la terminal N de la molécula (CXC, CC, CX₃C y C). Hasta la fecha se han identificado más de 50 y hasta 20 receptores (33). Secretadas en respuesta a señales de citoquinas proinflamatorias, se ocupan del reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como de inducir quimiotaxis a través de la activación de receptores unidos a proteína G (34). También se clasifican por su función en dos subfamilias: las inflamatorias controlan el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación y el daño tisular. Las homeostáticas se ocupan de tareas en relación con el paso de leucocitos a órganos linfoides, médula ósea y timo durante la hematopoyesis. Se ha relacionado las quimioquinas y sus receptores con gran cantidad de enfermedades, alteraciones inmunológicas, enfermedades pulmonares, enfermedad de injerto contra huésped, cáncer y enfermedades vasculares (35). La MCP-1 o proteína quimioatrayente de monocitos 1 (también

denominada CCL2 o ligando de quimioquinas 2) fue la primera quimioquina descubierta en la especie humana y pertenece a la familia de quimioquinas CC, con dos residuos adyacentes de cisteína. Es producida principalmente por células epiteliales en el pulmón, aunque también endoteliales, fibroblastos y dendríticas (35). Importante mediador en la respuesta precoz en el LIRI, se ocupa del reclutamiento de monocitos, células T y NK. Se ha demostrado el aumento de los niveles séricos de MCP-1 en modelos de LIRI en ratón (6,36) y cerdo (37), así como su papel promotor de la respuesta inflamatoria sistémica en respuesta a la hipoxia alveolar (38). En el ámbito del trasplante pulmonar en humanos, se ha descrito su importancia en la disfunción primaria del injerto y su utilidad pronóstica como biomarcador (39-40).

2.3.4.2 Otros mediadores

También han sido implicadas, por su papel en el LIRI, las moléculas de adhesión (41), el sistema de complemento (42) y los factores de transcripción como el NF κ B y el AP-1 (43).

2.3.5 Muerte celular: necrosis y apoptosis

2.3.5.1 Introducción

La muerte celular se puede producir por dos mecanismos: necrosis y apoptosis. La muerte por necrosis se debe a la pérdida de energía asociada a la depleción de ATP inducida por la hipoxia, que se produce en la fase de isquemia en las células pulmonares. Histológicamente se

caracteriza por la aparición de edema y posterior rotura de la membrana celular, con liberación de enzimas proteolíticas, dando lugar a fenómenos inflamatorios locales e infiltración leucocitaria (44). La apoptosis es una muerte celular programada. Un proceso biológico fundamental, dependiente de energía, por el que células del organismo que ya no son necesarias, se suicidan. Su función es imprescindible para mantener el número constante en las células de un tejido y en la homeostasis celular (45). Histológicamente se caracteriza por un encogimiento nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, dando lugar a los cuerpos apoptóticos. Al no producirse liberación de contenido celular al exterior, no se produce reacción inflamatoria (46). Aunque se ha establecido una relación directa entre el grado de deterioro de la función pulmonar tras la lesión IR y el porcentaje de tejido necrótico, no se ha encontrado relación con los fenómenos de apoptosis (47-48). Este hecho se puede explicar porque en la apoptosis, la fagocitosis de las células por parte de los macrófagos minimiza la liberación de enzimas y restos celulares que pueden actuar como activadores de la respuesta inflamatoria, fenómeno observado tras la muerte celular por necrosis (46). Tampoco se ha encontrado relación entre el porcentaje de células apoptóticas y parámetros como la presión parcial de oxígeno, mortalidad a los 30 días o tiempo de ventilación posoperatorio (49). El mecanismo predominante de muerte celular observado en modelos experimentales de LIRI es la apoptosis. En trasplante pulmonar humano, hasta el 30% de las células son apoptóticas a las 2 horas posreperusión, sin que existan

necesariamente implicaciones sobre la función del órgano trasplantado (4).

En un modelo animal de trasplante pulmonar en ratas se demostró que la apoptosis afectaba a dos tipos de células en el pulmón: linfocitos y células endoteliales. Cuando en este modelo se bloqueaba la actividad de las caspasas, disminuía la cantidad de células necróticas y mejoraba la función pulmonar, por lo que se dedujo que algunos mecanismos apoptóticos parecen dar lugar a la aparición de necrosis pulmonar (50-51). La actividad apoptótica se inicia en el LIRI durante la isquemia, aunque lleva al inicio de fenómenos de muerte programada de linfocitos y neumocitos inmediatamente tras la reperusión.

2.3.5.2 Ejecución de la apoptosis: las caspasas

Las caspasas son un grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un aminoácido cisteína que media la ruptura de otras proteínas (52). Son las principales ejecutoras de la apoptosis. Al activarse, ocasionan la rotura controlada de proteínas y estructuras celulares, desmontando ordenadamente la célula y dando lugar al fenotipo apoptótico (45). Se han identificado once caspasas, de las cuales al menos ocho se han implicado en la apoptosis.

Se dividen según su función:

- **Caspasas inflamatorias:** 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14.
- **Caspasas mediadoras**, que a su vez se dividen en:

- **Caspasas iniciadoras:** 2, 8, 9 y 10. Se activan tras un estímulo apoptótico mediante autoproteólisis, activando la cascada de las caspasas. Sus principales sustratos suelen ser las caspasas ejecutoras.
- **Caspasas efectoras de muerte o ejecutoras:** 3, 6 y 7. Encargadas de desmontar las estructuras celulares para su fagocitosis por macrófagos.

2.3.5.3 Vías de la apoptosis

La apoptosis se puede desencadenar tras una agresión de tipo mecánico o tras la exposición a determinadas condiciones medioambientales que dan lugar a la activación de la vía intrínseca (o mitocondrial) y la extrínseca (receptor muerte). Ambas vías están reguladas por la mitocondria (figura 2):

- **VÍA INTRÍNSECA:** Las radiaciones ionizantes, los agentes quimioterápicos, el estrés oxidativo y la privación de citoquinas actúan como desencadenantes, alterando la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria –controlada por proteínas de la familia Bcl-2. El mismo efecto se puede obtener tras la activación de proteínas proapoptóticas (como las Bid y Bax) por ROS (53).
- **VÍA EXTRÍNSECA:** Se desencadena por la activación de un complejo receptor de superficie celular-ligando cuando el tejido pulmonar es sometido a isquemia: TNF con receptor-TNF, Fas con ligando-Fas, o angiotensina All/All-receptor. Se produce la activación de la caspasa 8 (iniciadora), que a su vez activa a la 9 y a las 3, 6 y 7 (ejecutoras). Éstas, a través de la poli-ADP ribosa polimerasa o PARP, inducen la

fragmentación del ADN. La caspasa 8 también es responsable de la activación de la vía intrínseca, mediante la segmentación de la proteína Bid, lo que a su vez actúa como desencadenante para la liberación de citocromo c de la mitocondria, activando la caspasa 9 y el resto subsecuentemente (46).

2.3.5.4 Papel de las proteínas de la familia Bcl-2

Familia formada por alrededor de 25 proteínas encargadas de regular los procesos de permeabilización mitocondrial. Se dividen en dos tipos en función de su actividad proapoptótica (Bax, Bak, Bid, Bad...) y antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-X_L, A1, Mcl-1...) (52). Las proteínas proapoptóticas Bid y Bax, inducidas por el estrés oxidativo, activan los mecanismos de apoptosis a través de la vía intrínseca. La segmentación de la proteína Bid aumenta la permeabilidad mitocondrial, produciendo una alteración del potencial transmembrana interno mitocondrial que a su vez induce la liberación de citocromo c a través de la membrana mitocondrial externa (53). La liberación de citocromo c y APAF-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas -1) por la mitocondria, junto a la caspasa 9, forman un apoptosoma que activa la caspasa 3 y, subsecuentemente, la cascada de las caspasas hasta producirse la apoptosis (46). La Bcl-2 fue la primera proteína de la familia en ser identificada, recibiendo su nombre por ser descubierta en células de linfoma folicular (*B-cell lymphoma-2*). Su función parece estar relacionada con la estabilización de la membrana mitocondrial, evitando la salida de citocromo c y con ella la formación del apoptosoma, e inhibiendo la

apoptosis al impedir la activación de la caspasa 3 (54). Se ha observado la disminución de los niveles de Bcl-2 en varios modelos de IR animal (55-57), permitiendo la aparición de fenómenos apoptóticos. El aumento de su expresión previamente a un trasplante pulmonar en un modelo animal, demostró disminuir la muerte celular por apoptosis, la menor expresión de caspasas 3 y 9, y una menor liberación de citoquinas medidas en el injerto (58).

2.4 Estrategias de prevención del daño por isquemia-reperfusión pulmonar

Cada año es mayor el número de situaciones en las que se precisa someter tejido pulmonar a periodos de isquemia (trasplante pulmonar, cirugía torácica, cirugía cardiovascular...). Éstos pueden ser de isquemia caliente, cuando se interrumpe la circulación sin extraer el órgano del individuo, manteniendo la temperatura al mismo nivel. O de isquemia fría, cuando se preserva el órgano fuera del individuo a baja temperatura (4° C). A continuación se citan algunas de las estrategias en las que se sigue trabajando para disminuir el LIRI (1,59):

1. Soluciones de preservación pulmonar: Con el objetivo de prevenir la acidosis, disminuir el edema celular y la entrada del calcio a la célula, el daño inducido por los ROS y aumentar el ATP. Se dispone de dos tipos, intracelulares (con más potasio y menos sodio) como la Euro-Collins y la de la Universidad de Wisconsin, y extracelulares (más sodio y menos potasio) como la LPD o la de Celsior.

2. Quelantes del hierro
3. Óxido nítrico: Ampliamente usado aunque controvertido.
4. Inhibidores del complemento: El inhibidor del receptor 1 del complemento se ha utilizado satisfactoriamente para bloquear la cascada de activación del complemento, con resultados clínicos prometedores.
5. Inhibidores de moléculas de adhesión: Con buenos resultados en clínica, producto de la disminución de expresión de ICAM-1.
6. Administración exógena de surfactante pulmonar
7. Precondicionamiento isquémico y anestésico

2.5 Modulación del daño por isquemia-reperfusión pulmonar mediante preconditionamiento anestésico

2.5.1 Sevoflurano

El sevoflurano es un anestésico general volátil, incoloro, líquido a temperatura ambiente y que se caracteriza por un olor agradable no irritante de la vía aérea. Es un derivado fluorado del metil-isopropil-éter que contiene siete átomos de flúor (halógeno), por lo que pertenece al grupo de los gases halogenados (60). El 95% se elimina íntegro por vía inhalatoria. Su biotransformación es inferior al 5%, generándose flúor inorgánico y hexafluoroisopropanolol, que son rápidamente excretados por vía urinaria. A nivel hemodinámico, inhibe la actividad simpática por lo que es inotrópico negativo. Disminuye la tensión arterial en relación inversa con la su concentración alveolar, sin alterar la frecuencia cardíaca. Además disminuye el gasto cardíaco sin que se muestren alteradas las resistencias vasculares sistémicas. Es depresor de los sistemas respiratorio y nervioso central en modo dosis-dependiente, deprimiendo la función cortical, aunque no modifica los mecanismos de autorregulación cerebral ni provoca actividad convulsiva. Aumenta ligeramente la presión intracraneana. Disminuye discretamente el flujo hepático sin modificar el flujo sanguíneo renal en pacientes normotensos (61).

2.5.2 Precondicionamiento anestésico con sevoflurano

Precondicionamiento: m. sust. 1. Exposición de un órgano o tejido a estímulos subletales (de tipo isquémico, térmico, estrés oxidativo, farmacológico, etc...) que, por diferentes mecanismos, va a conferir resistencia ante un estímulo nocivo posterior.

El concepto de precondicionamiento aplicado a la lesión IR se empieza a gestar en el año 1981 tras los resultados de Reimer y colaboradores sobre el papel del ATP en la lesión miocárdica en un modelo experimental en perros (62). Murry y colaboradores (63) publican los resultados de un trabajo en perros lo que se denominó **precondicionamiento isquémico**: periodos de isquemia y perfusión ayudaban al cardiomiocito a adaptarse rápidamente a la isquemia, de modo que tras 40 minutos de un nuevo periodo isquémico disminuía el tamaño de los infartos hasta en un 25%. Posteriormente se descubrió que además de limitar el tamaño del infarto, prevenía la aparición de arritmias, disminuía el aturdimiento miocárdico y aceleraba la recuperación de la función cardíaca tras la isquemia (64). Cason y colaboradores (65) introducen el concepto de **precondicionamiento anestésico** cardíaco, cuando la exposición previa de isoflurano activaba un mecanismo protector del miocardio, comportándose de modo muy similar al precondicionamiento isquémico.

Los mecanismos precisos de la protección por halogenados siguen sin conocerse bien. A nivel miocárdico, se sabe que actúan sobre los canales de K_{ATP} (mitocondrial y sarcolémico) y sobre la membrana celular. Provocan una señal intracelular mediada por la familia de la proteína G, que a su vez activará a la proteinquinasa C, actuando sobre la

mitocondria. Este proceso celular lleva a la apertura de los canales de K_{ATP} (66), reduciéndose su sensibilidad para cerrarse ante la ausencia de ATP, aumentando la probabilidad de permanecer abiertos (67) (figura 1). Esto provoca en el músculo liso coronario una vasodilatación que mejora el aporte de oxígeno y en cierto modo protege durante la isquemia, cuando la producción de ATP se ve reducida (68). Además, el sevoflurano induce un incremento de la circulación colateral mediado por los canales de K_{ATP} (69).

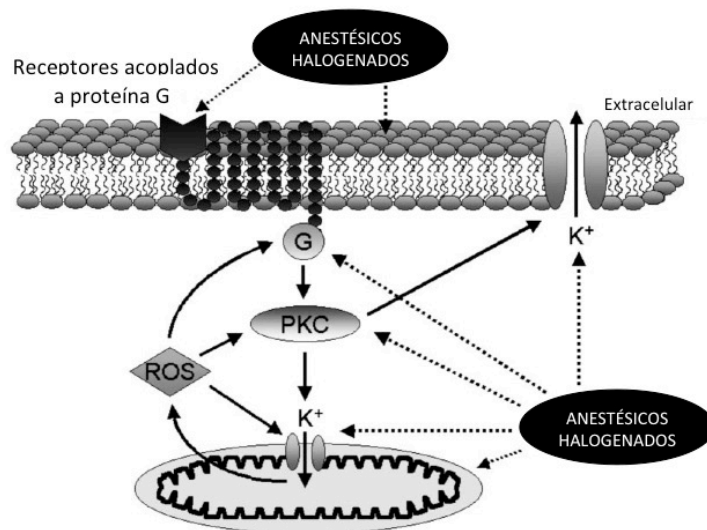


Figura 1. Mecanismo acción del preconditionamiento de los agentes volátiles (modificado de Tanaka 2004).

Las características del preconditionamiento con halogenados son:

- **MEMORIA CELULAR:** El miocardio “recordaba” la exposición al agente inhalado, disminuyendo el tamaño del infarto en perros (70).
- **DOSIS DEPENDIENTE:** Diversos trabajos demuestran los efectos dosis-dependientes de los halogenados frente a la IR cardíaca (71-72).
- **COMPORTAMIENTO BIFÁSICO:** La primera ventana, con una duración de acción de 2-4 horas tras la administración del halogenado. Y la segunda ventana, que ofrece protección tras 24 horas (73).

En los últimos años se han demostrado propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas del sevoflurano en la IR hepática (74), renal (75) , intestinal (76) y sobre el sistema nervioso central (77). A nivel pulmonar, surgen cada vez más estudios que demuestran los efectos protectores del isoflurano (78), el halotano (79) y sevoflurano (80-81) en modelos experimentales de ALI. De Conno y colaboradores demostraron los efectos del sevoflurano sobre el reclutamiento de neutrófilos y la expresión de citoquinas proinflamatorias (82). En 1999 se demostró por primera vez la disminución del edema pulmonar y la permeabilidad vascular pulmonar (83) en la IR pulmonar con isoflurano. Posteriormente se ha demostrado la modulación de la expresión de mediadores inflamatorios en un modelo en roedores *in vitro* (80), si bien la ausencia de análisis histológicos limitó la valoración de la lesión pulmonar y el hecho de no tener neutrófilos circulantes impidió comprobar la implicación otros posibles mecanismos descritos en otros órganos (84-86). Recientemente se ha publicado el único estudio que evalúa los efectos

citoprotectores del sevoflurano en un modelo de IR porcino (87). De especial relevancia por ser un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdos que, además de incluir el daño pulmonar asociado a la ventilación unipulmonar, tiene una gran similitud con la especie humana. Se demuestran los efectos citoprotectores del sevoflurano, modulando la respuesta inflamatoria, en muestras homogeneizadas de tejido pulmonar.

En nuestro trabajo vamos a estudiar el posible beneficio del sevoflurano sobre la modulación de la expresión de mediadores de la inflamación y la apoptosis en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo. La importancia del modelo radica, especialmente, en la similitud entre el organismo porcino y el humano y, por tanto, en la posibilidad de extrapolar los resultados y conclusiones. Intentaremos demostrar por primera vez sus efectos protectores a nivel histológico e inmunohistoquímico.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El proceso de isquemia-reperfusión pulmonar induce una respuesta inflamatoria y apoptótica local resultante de la activación de mediadores celulares y moleculares del tejido pulmonar. El tratamiento o el preconditionamiento con anestésicos halogenados, como el sevoflurano, han mostrado que pueden proteger a diferentes tejidos del daño por isquemia reperfundida, aunque aún no se conocen bien los mecanismos precisos. Nos planteamos la hipótesis de que los efectos de un preconditionamiento anestésico con sevoflurano, administrado al donante durante un proceso de trasplante pulmonar, podría disminuir la respuesta inflamatoria y apoptótica del pulmón trasplantado y que ésta modulación podría observarse desde los primeros momentos de la reperfundida pulmonar en estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

3.2 Objetivos

El objetivo principal es estudiar, en pulmón, los efectos precoces, histológicos e inmunohistoquímicos de la isquemia-reperfusión pulmonar, usando un modelo experimental de autotrasplante de pulmón en cerdo, y analizar los posibles efectos del preconditionamiento anestésico con sevoflurano.

Los objetivos específicos para alcanzar el objetivo principal fueron:

1. Estudiar los cambios morfológicos, en tejido del pulmón trasplantado, al principio de la reperfundida y analizar si el preconditionamiento con sevoflurano modifica dichos cambios.

2. Investigar si la respuesta inflamatoria a isquemia reperusión pulmonar puede observarse en éste modelo mediante estudios inmunohistoquímicos que detecten infiltración monocito/macrofágica.
3. Investigar si la expresión inmunohistoquímica de la quimioquina proinflamatoria, proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1, se modifica precozmente durante al reperusión y si se asocia con el grado de infiltración monocito/macrófaga observado.
4. Estudiar si la respuesta apoptótica a la isquemia reperusión pulmonar y el posible efecto del preconditionamiento con sevoflurano pueden observarse, en éste modelo, mediante estudios inmunohistoquímicos que detecten expresión de la proteína proapoptótica Caspasa 9 o la proteína antiapoptótica Bcl-2.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Resumen

Este estudio se realiza en un modelo de isquemia-reperfusión pulmonar, consistente en la realización de un autotrasplante pulmonar en cerdo. El procedimiento quirúrgico concluye a los 30 minutos de reperfundir del lóbulo pulmonar implantado, realizándose previamente biopsias del mismo para realizar estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Sobre este modelo experimental, se estudia el posible efecto protector del preconditionamiento anestésico con gas halogenado sevoflurano.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Instalaciones

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados en el quirófano de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con número de registro EX/017-U de la Comunidad de Madrid.

El procesamiento de las muestras histológicas, las técnicas de tinción convencional e inmunohistoquímicas, el estudio mediante microscopía óptica de las preparaciones histológicas, la adquisición de imágenes mediante fotografía digital de campos microscópicos y el procesamiento de las mismas mediante programas informáticos se realizaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y en el Laboratorio de Neurobiología de la

Audición del Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

4.2.2 Material biológico: animales

Para la realización del experimento se han utilizado cerdos de la raza Large White. Los animales proceden del Complejo Agropecuario de Aranjuez (finca “La Chimenea”), del Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario que pertenece a la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid. 24 horas antes de la realización del procedimiento, se traslada a los animales a la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental (UMCE) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid en una jaula individual, donde permanecen hasta la intervención. El animalario dispone de un ambiente controlado con temperatura de 20-22° C y humedad relativa del 55%.

Se ha tratado a los animales de acuerdo con la normativa legal según el Real Decreto 1201/2005 Protección de los Animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), que incorpora las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, de la Directiva del Consejo 86/609/CEE (Leg. CC.EE. 4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996. El estudio recibió la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal y del Comité de Investigación de la Institución.

4.2.3 Material quirúrgico y anestésico

En cuanto al material anestésico, el quirófano cuenta con un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical AG, Lübeck, Alemania), Capnógrafo Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health Care, USA) (figura 2), analizador de Gases GEM Premiere 5000, Monitor de Swan-Ganz Gasto Continuo (Edwards, Irving, California, USA) y desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA).



Figura 2. Respirador modelo Dräger SA 1.

Material fungible y sistemas de monitorización:

- Tubo endotraqueal: estándar, con agujero de Murphy y balón, para la intubación orotraqueal. Del número 5,5 - 7 dependiendo, del peso del espécimen.

- Catéteres vasculares: 9 y 7,5 French para canalización de arteria y vena femorales, respectivamente, mediante técnica de Seldinger.
- Catéter de Swan-Ganz: En nuestro caso usamos un catéter de Swan-Ganz Edwards de 7,5 French de cuatro luces para monitorización continua del gasto cardiaco (Edwards, Irving, California, USA).

4.2.4 Monitorización y técnica anestésica

En todos los casos los animales guardaron ayunas para alimentos sólidos 24 horas antes de la intervención, permitiendo el consumo de agua hasta el momento de la intervención. Se premedicó a todos los animales con ketamina (“Ketoral”, Parker Davis) intramuscular a 20 mg/kg de peso intramuscular y atropina 0,04 mg/Kg intramuscular quince minutos antes del procedimiento. Se canalizó una vía periférica en el dorso de la oreja con un catéter del calibre 20 - 22 G y se procedió a la desnitrogenación de los animales con oxígeno al 100% administrado mediante mascarilla durante 3 minutos. Se procedió a la inducción anestésica intravenosa con fentanilo (“Fentanest”, Kern Pharma) a 3 µg/kg, propofol 1% (“Diprivan”, Fresenius K) a 4 mg/kg y atracurio (“Tracrium” Glaxo Smith Kline) a 0,6 mg/kg. La intubación se realiza inicialmente por boca con un tubo orotraqueal y a continuación se inicia la ventilación mecánica con el respirador Drager SA 1, ajustado con los siguientes parámetros: ventilación controlada por volumen con FiO₂ de 1, un volumen corriente de 8 ml/kg, entre 12 y 15 respiraciones por minuto y

relación inspiración:expiración de 1:2. Estos parámetros se modifican durante la cirugía para mantener normocapnia. A continuación, se realiza una traqueostomía infrahístmica que permite la introducción de un tubo endotraqueal a su través, que se progresa hasta el bronquio intermediario derecho para iniciar la ventilación selectiva de ese pulmón.

Se agrupó a los animales de forma aleatoria (Microsoft Excel 2003) para incluir a cada cerdo en uno de los siguientes grupos: autotrasplante pulmonar sin sevoflurano (grupo control CON, n = 6), con sevoflurano (grupo SEVO, n = 6) o grupo de cirugía simulada o Sham (SHAM, n = 4), a los que solo se le realizó la toracotomía, sin resección pulmonar y sin preconditionamiento anestésico (considerado el control del grupo CON).

- Grupo CON. Mantenimiento con propofol en perfusión continua intravenosa a 8-10 mg/Kg/h.
- Grupo SEVO. Se administra sevoflurano al 3% hasta iniciar la ventilación unipulmonar, momento en que se inicia el mantenimiento con propofol hasta el final de la intervención, a la misma dosis que en el grupo control.

En ambos grupos se administró fentanilo y atracurio intravenoso en bolos, a demanda. Relativamente a la fluidoterapia intravenosa, en todos los grupos se administró la solución cristaloides de lactato de ringer a 6 – 8 ml/Kg/h, recurriendo al coloide hidroxietil almidón (“Voluven”, Fresenius Kabi) en los casos en que fue preciso.

En cuanto a la monitorización, consistió en:

- Electrocardiograma de tres derivaciones
- Pulsioximetría
- Capnografía
- Presión arterial invasiva en la arteria femoral
- Presión venosa central en la vena femoral
- Gasto cardíaco con catéter de Swan-Ganz de 4 lúmenes, de tamaño 7 French (Edwards Lifesciences),

La canalización de arteria y vena se realizó de modo percutáneo. Cuando no fue posible, se procedió a la disección del paquete vásculo-nervioso de forma quirúrgica. El catéter de Swan-Ganz se avanzó por la arteria femoral hasta el tronco de la arteria pulmonar o hasta la arteria pulmonar derecha. La colocación correcta del catéter de arteria pulmonar se realiza guiándose por monitorización continuada de la curva de presión, así como por comprobación directa por el equipo quirúrgico. Con estos datos se calculan las resistencias vasculares sistémicas y pulmonares durante los diferentes estudios hemodinámicos que tienen lugar a lo largo del experimento. Además, se registró la diuresis horaria, para lo que fue necesaria la realización de una cistostomía suprapúbica mediante mini-laparotomía.

4.2.5 Protocolo quirúrgico

Completados los pasos anteriores, se coloca al animal en decúbito lateral derecho y se lava la piel con solución de povidona yodada. La cirugía, que es exactamente igual en los grupos CON y SEVO, consiste en la realización de un autotrasplante pulmonar izquierdo, realizando secuencialmente una neumonectomía izquierda, lobectomía craneal izquierda ex-situ (cirugía de banco) y reimplantación del lóbulo caudal mediante anastomosis bronquial, arterial y venosa.

1. **Toracotomía izquierda.** A través del 4º espacio intercostal. Aún en ventilación bipulmonar.
2. **Apertura bronquial.** Previamente se avanza hasta el bronquio derecho el tubo que se ha colocado a través de la traqueostomía, iniciando la ventilación unipulmonar protectora (volumen corriente de 6 ml/Kg y aumento de la frecuencia respiratoria entre 14–16 respiraciones/minuto). A continuación se secciona el bronquio izquierdo.
3. Se completa la **neumonectomía izquierda** una vez pinzadas y seccionadas la vena inferior y la arteria pulmonar izquierdas. Para prevenir la trombosis de la arteria pulmonar (pinzada durante la cirugía de banco y el reimplante), se administra por vía intravenosa un bolo de 300 UI/Kg de heparina sódica (Mayne Pharma España, S.L.).
4. **Cirugía de banco.** Se perfunde de forma anterógrada y retrógrada el injerto con 1 litro de solución de Wisconsin a 10-15° C. Es ventilado en

todo momento con un ambú y FiO₂ aire ambiente (21%), mientras se realiza la lobectomía craneal ex-situ (figura 3).

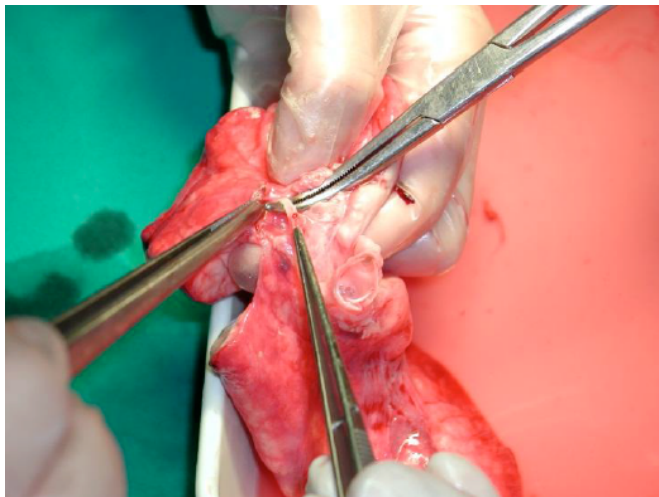


Figura 3. Cirugía de banco

5. Reimplantación. Del lóbulo caudal izquierdo y reperusión, previa anastomosis con sutura continua del bronquio, arteria y vena. Se reinicia la ventilación bipulmonar y se mantiene la reperusión durante 30 minutos.

Finalmente se procede a la eutanasia del animal, previa profundización del plano anestésico, mediante inducción de cardioplejia con cloruro potásico.

4.2.6 Diseño experimental

El experimento se realizó en 16 especímenes que fueron divididos en tres grupos:

- **GRUPO CONTROL (CON)** (n = 6): Al que se le realizó el protocolo quirúrgico ya descrito, realizándose el mantenimiento anestésico con propofol en perfusión continua durante todo el procedimiento (8-10 mg/Kg/h).
- **GRUPO PRECONDICIONAMIENTO CON SEVOFLURANO (SEVO)** (n = 6): Se le realizó el mismo protocolo quirúrgico, pero se le administró sevoflurano al 3% hasta el momento de iniciar la ventilación unipulmonar, momento en que se continúa hasta el final con propofol a la misma dosis que en el grupo control.
- **GRUPO SHAM (SHAM)** (n = 4): La técnica anestésica es igual al grupo control, pero no la quirúrgica, ya que se le realizó solo una toracotomía, manteniendo siempre la ventilación bipulmonar.

4.2.7 Momentos de medición y toma de muestras

A continuación se indican los 3 momentos de recogida de muestras del experimento (figura 4):

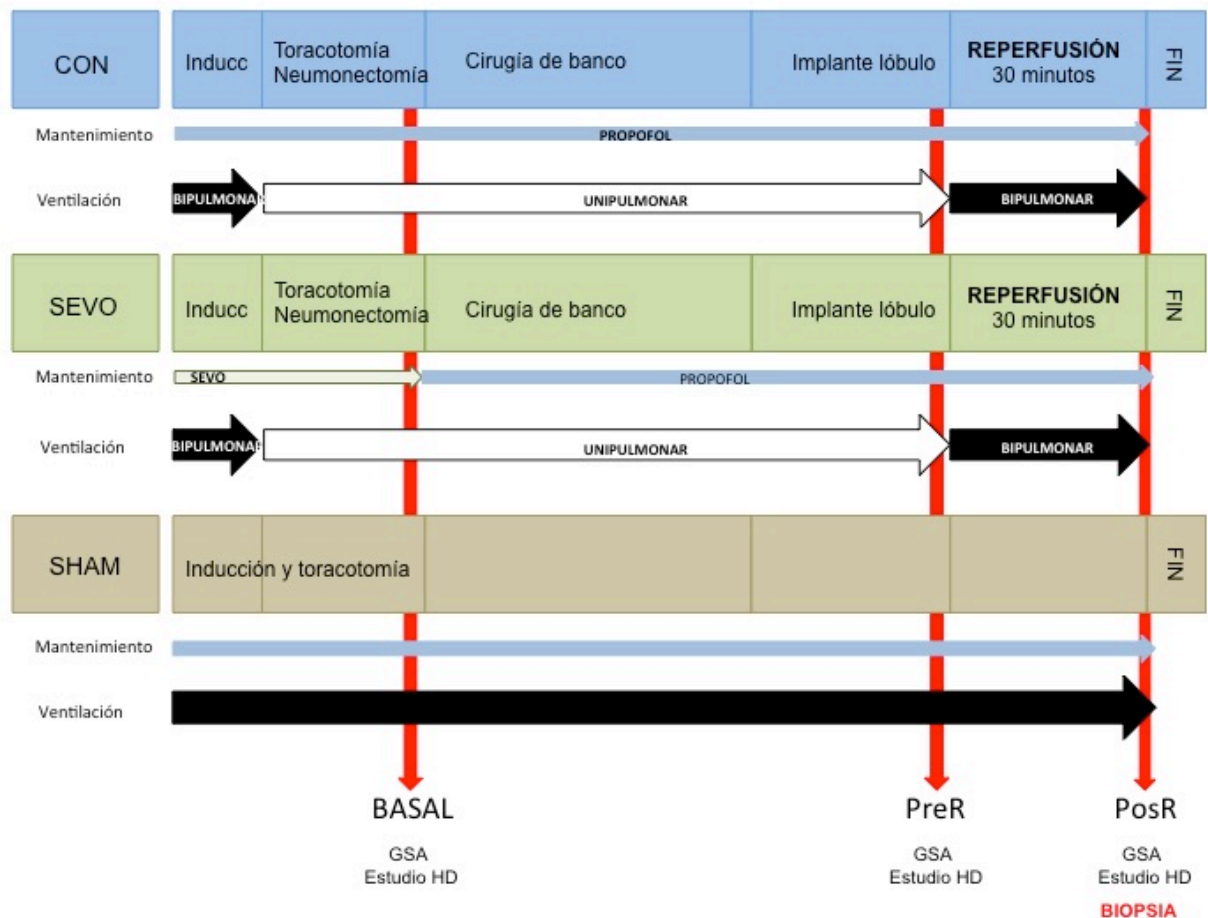


Figura 4. Esquema del experimento con momentos de recogida de muestras. CON: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo de cirugía simulada. PreR: prerperfusión. PosR: posreperfusión. GSA: gasometría arterial. HD: hemodinámico.

- **Basal:** Transcurridos 30 minutos del inicio de la toracotomía, aún en ventilación bipulmonar. Se realiza gasometría de sangre arterial y se registran variables hemodinámicas.
- **Prerperfusión (PreR):** 10 minutos antes de reperfundir el lóbulo pulmonar implantado se realiza nuevo registro hemodinámico y gasometría arterial.
- **Posreperfusión (PosR):** A los 30 minutos de reperfundir el injerto se vuelven a registrar las variables hemodinámicas, se realiza una gasometría arterial y se toma una biopsia del tejido pulmonar.

Las tomas de gasometría, datos hemodinámicos y biopsia de tejido pulmonar se realizaron como se indica en la tabla 1. Las biopsias se conservaron en parafina. En el grupo SHAM, donde no se realiza neumonectomía, las determinaciones PreR se realizaron 120 minutos tras el inicio de la toracotomía. 30 minutos después se realizaron las determinaciones PosR.

Tabla 1. Estudios realizados en cada momento de recogida de muestras.

	Gasometría arterial	Estudio hemodinámico	Biopsia de tejido pulmonar
Basal	✓	✓	
PreR	✓	✓	
PosR	✓	✓	✓

PreR: prerperfusión. PosR: posreperfusión.

4.2.8 Obtención y preparación de las muestras

Muestras de sangre arterial: Las muestras de sangre arterial se analizaron inmediatamente mediante el analizador de gases.

Tejido pulmonar: Las biopsias se extraen siempre del lóbulo reimplantado, se fijan en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas y se incluyen posteriormente en parafina.

4.2.9 Variables estudiadas

- A. **Hemodinámicas:** presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM). Mediante el catéter de arteria pulmonar se registra la presión capilar pulmonar (PCP) y por termodilución se registra el índice cardiaco (IC).
- B. **Gasométricas:** Presión arterial de oxígeno (PaO_2), presión arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) y pH sanguíneo arterial, siendo todas las muestras procedentes de la arteria femoral.

4.2.10 Procesamiento de las muestras de tejido pulmonar

Las muestras fueron tomadas del lóbulo caudal del pulmón izquierdo (el reimplantado) a los 30 minutos de iniciar la reperfusión. Inmediatamente después de su obtención, las muestras se fijan en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M pH 7,4. Posteriormente se procede a su inclusión en bloques de parafina para ser seccionado (microtomo Leica RM 2135) en cortes de $4\mu\text{m}$ de grosor. Los cortes obtenidos fueron distribuidos, de manera seriada, en portaobjetos de vidrio. Se desparafinan con xileno y se rehidratan utilizando alcoholes de graduación sucesiva (100° - 95° - 70°), tras lo cual se lavan con agua destilada.

4.2.10.1 Tinción hematoxilina-eosina

Descripción de la técnica

Se realiza la técnica mediante el **método de Harris**, que comprende los siguientes pasos:

1. Los portas se colocan en cestillos que se introducen durante 8-15 minutos en la solución de hematoxilina de Harris.
2. Se lava el exceso de hematoxilina con agua corriente.
3. Se diferencian con una mezcla de ácido hidrociorhídrico al 1% y etanol 70% durante 5 o 10 segundos.
4. Se aclaran con agua.
5. Se azulean las preparaciones durante 30 o 90 segundos en una solución de amoníaco débil o en una solución de carbonato de litio.
6. Lavado con agua 5 o 10 minutos.
7. Se introducen durante un período entre 15 segundos y 3 minutos en la solución de eosina.
8. Se deshidratan en etanol al 70°, 95° y 100° posteriormente.
9. Finalmente se introducen en xileno durante 10 minutos y se montan.

Las secciones fueron estudiadas utilizando un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRB), conectado a una cámara (Nikon DS-F1) y el programa NIS-Elements F de captura de imágenes.

Examen de las muestras y cuantificación

En base a los cambios histológicos observados mediante microscopía óptica en biopsias de tejido pulmonar tras trasplante o IR descritas en la literatura (5), (88) (destrucción de la arquitectura alveolar, edema intersticial, exudación de eritrocitos al espacio alveolar, aparición

de membranas hialinas a lo largo de los ductos alveolares, infiltrado leucocitario en vasos e intersticio pulmonar y desunión entre células endoteliales y entre neumocitos), se determinó en cada muestra:

1. Existencia de infiltrado inflamatorio: La ausencia total de infiltrado inflamatorio se clasifica como 0. En caso de existir inflamación, se evalúa la predominancia de los distintos tipos de células inflamatorias:
 - Monocito-macrófagos.
 - Neutrófilos.
 - Linfocitos.
2. Edema: Se valora la presencia de edema en septos alveolares y en cisuras interlobares-interlobulillares.
3. Congestión pulmonar: Valoramos la presencia de vasos de tipo capilar o arteriolas de pequeño calibre dilatados, rellenos de hematíes.

Cada uno de los parámetros es analizado según un sistema de puntuación semi-cuantitativo valorando la severidad de la lesión mediante una escala del 0-3:

- 0: Inexistente
- 1: leve
- 2: Moderado
- 3: Severo

4.2.10.2 Técnicas inmunohistoquímicas

Descripción de la técnica:

El procesamiento inicial de las muestras para la IHQ es similar al que se sigue para la tinción rutinaria con hematoxilina-eosina.

El estudio de la existencia de los diferentes antígenos presentes en las muestras, se realizó mediante detección IHQ de visualización indirecta con anticuerpo secundario (Ac-II) biotinilado. Los Ac primarios (Ac-I) específicos elegidos para el presente estudio fueron:

- 1) **Anti-Bcl-2** (1:100, Novus Biologicals, 8C8, monoclonal, hecho en ratón)
- 2) **Anti-Caspasa 9** (1:100, Biorbyt, orb1677, policlonal, hecho en conejo)
- 3) **Anti-MCP-1** (1:100, MyBioSource, MBS2027425, policlonal, hecho en conejo)
- 4) **Anti-CD 68** (1:100, MyBioSource, MBS370038, monoclonal, hecho en ratón)

Para ello, tras la hidratación de los cortes de parafina, se realizó una inhibición de las peroxidasas endógenas del tejido mediante la incubación de las muestras durante unos minutos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Posteriormente, se realizó otra incubación con el suero del animal del que se extrae el Ac-II, para evitar su unión inespecífica en

el tejido, junto con un detergente (Tritón-X100, Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana plasmática y permitir el acceso de los productos al interior de la célula.

La detección del Ag deseado se realiza mediante la incubación de la muestra con el Ac-I específico (24h, 4°C y oscuridad), tras lo cual, las muestras se lavaron con PBS (0.1M, pH 7.4) y se incubaron con el Ac-II biotilnado (1:200, 1h, temperatura ambiente y oscuridad). El Ac-II se unirá específicamente al Ac-I para amplificar la reacción Ag-Ac-I.

Los Ac-II están biotinilados para permitir la unión de estos con el complejo avidina-biotina. Este complejo contiene una peroxidasa, que cataliza la liberación de oxígeno, a partir de H_2O_2 , que afectará a un sustrato oxidable, la diaminobencidina (DAB), incluida en la última solución de incubación del proceso. La DAB oxidada es insoluble en agua y precipita sobre el complejo Ag-Ac. Así, el precipitado resultante de este proceso, de color marrón-rojizo, evidencia la reacción Ag-Ac en el tejido y por tanto hace patente la localización del antígeno en la célula.

Del mismo modo que las teñidas con hematoxilina-eosina, las secciones fueron estudiadas utilizando un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRB), conectado a una cámara (Nikon DS-F1) y el programa NIS-Elements F de captura de imágenes (figura 5).

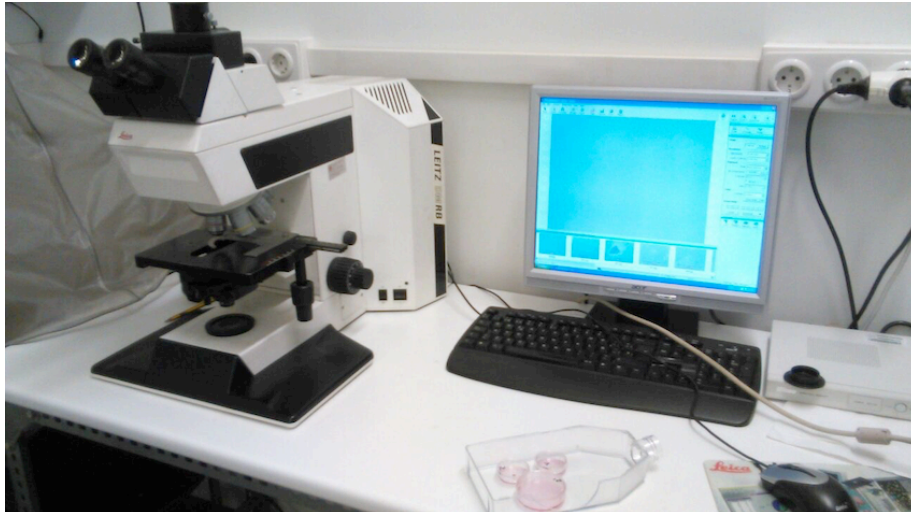


Figura 5. Fotomicroscopio Leica Leitz DMRB y cámara Nikon DS-F1.

Visualización y métodos de cuantificación:

Para la presentación de resultados de las tinciones inmunohistoquímicas (CD68, MCP-1, caspasa 9 y Bcl-2) se realiza un estudio descriptivo y un estudio analítico de las variables cuantitativas (Bcl-2, CD68 y MCP-1) y semicuantitativas (caspasa 9).

1. Estudio descriptivo de las tinciones inmunohistoquímicas:

Para cada anticuerpo del estudio se describirá la tinción de la muestra pulmonar considerando el tipo de células teñidas, en qué tipo celular prevalece la tinción, la localización citoplasmática, nuclear o mixta de ésta y la intensidad de la tinción.

2. Análisis semicuantitativo y cuantitativo:

Semicuantitativo. Caspasa 9: De cada muestra de pulmón se fotografiaron diez campos de gran aumento (40x; captura de imagen de 0,035mm²) eligiendo áreas de predominio alveolar, evitando zonas de desestructuración o hemorrágicas. Dos observadores independientes y desconocedores del origen de la muestra, con ayuda del programa informático ImageJ 1.51j8, asignaron a cada campo seleccionado un porcentaje de células neumocitarias teñidas respecto al conjunto de células neumocitarias que se distinguen en todas las paredes alveolares del campo. Este porcentaje se transformó en una variable semicuantitativa de la siguiente forma:

- 0 = Ausencia de tinción
- 1 = Tinción en menos del 50% de las células
- 2 = Tinción en más del 50% de las células

En caso de discrepancia, los dos observadores revisaron la muestra para alcanzar un acuerdo. Se le asignó a cada muestra pulmonar (correspondiente a un experimento) el valor de la mediana de los valores de los diez campos observados. Se consideró tinción celular positiva a cualquier grado de tinción, difusa o granular, citoplasmática o nuclear, en células claramente diferenciables, y el recuento de células neumocitarias se realizó contando núcleos claramente diferenciables.

Cuantitativo. CD68, MCP-1 y BCL-2: De cada muestra de pulmón se fotografiaron diez campos de gran aumento (40x; captura de imagen de

0,035mm²) eligiendo áreas de predominio alveolar, evitando zonas desestructuradas o hemorrágicas. Dos observadores, independientes y desconocedores del origen de la muestra, contaron, con ayuda del programa informático ImageJ 1.51j8, el número de células teñidas en cada campo. En caso de discrepancia, los dos observadores revisaron la muestra para alcanzar un acuerdo. Se le asignó a cada muestra pulmonar (correspondiente a un experimento) el valor de la media de los valores de los diez campos observados. Sólo se contaron aquellas células claramente individualizables y con tinción claramente positiva citoplasmática o nuclear.

4.2.11 Análisis de datos y tratamiento estadístico

Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confeccionó una base de datos con el programa IBM_SPSS_Statistics_24 para MAC. Las variables cualitativas y semicuantitativas (grado de inflamación, tipo de célula inflamatoria, grado de edema y grado de congestión) se expresan con la frecuencia (porcentaje). Las cuantitativas se presentan como media (error típico) cuando siguen una desviación normal.

En lo que respecta al análisis de las variables semicuantitativas, estas son tratadas como variables cualitativas, empleando el test de Chi-cuadrado para detectar diferencias entre los grupos de estudio. Los resultados son expresados en una tabla de contingencia.

Para identificar las diferencias significativas entre los grupos en las variables cuantitativas se utiliza el test de Kruskal-Wallis. Posteriormente, para analizar los pares de muestras específicos y encontrar diferencias significativas se usa el Test de Mann-Whitney. La significación estadística es establecida con $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Variables generales

En el análisis de las variables peso y tiempo total de intervención, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control (CON), cirugía simulada (SHAM) y preconditionamiento con sevoflurano (SEVO) (tabla 2). Del mismo modo, no hubo diferencias entre los tiempos de isquemia de los grupos CON y SEVO (tabla 2).

Tabla 2. Variables demográficas y tiempos quirúrgicos

VARIABLE	GRUPO	VALOR	P
Peso (Kgs.)	CON	47,67 (6,30)	> 0,05
	SEVO	33,5 (3,39)	
	SHAM	34 (2,04)	
Tiempo de isquemia (minutos)	CON	99,83 (8,30)	> 0,05
	SEVO	103,3 (3,02)	
	SHAM		
Tiempo total de intervención (minutos)	CON	295 (6,83)	> 0,05
	SEVO	306,67 (4,94)	
	SHAM	291,25 (5,54)	

Los resultados se expresan como media (error típico). CON: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo cirugía simulada.

5.2 Variables hemodinámicas

▪ Presión arterial media (PAM)

En el grupo sevoflurano se encontró una disminución de la presión arterial media en la medición basal con respecto al grupo sham (SEVO vs SHAM, $p=0,01$) y control (SEVO vs CONTROL, $p=0,004$). (tabla 3, figura 6).

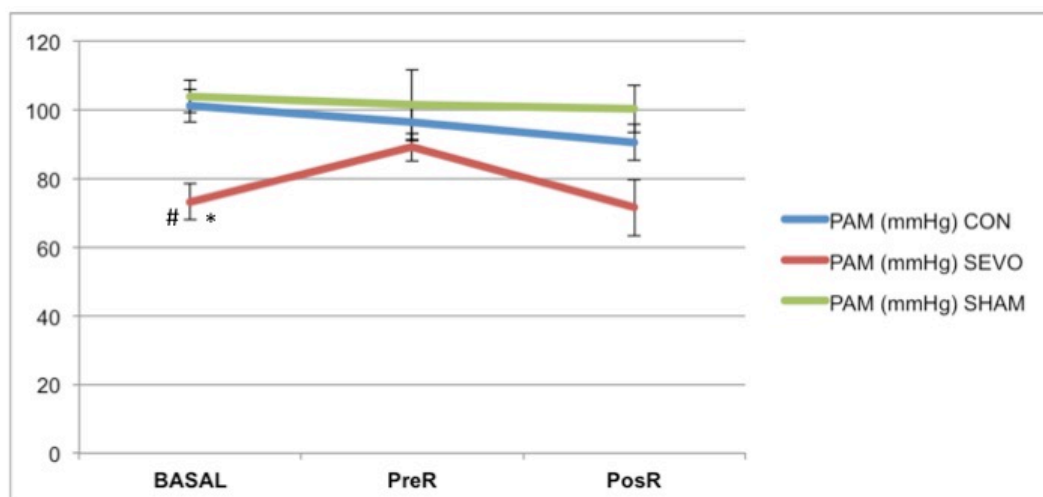


Figura 6. Evolución de la presión arterial media en los distintos grupos durante el experimento (mmHg). PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham. *: p=0,004, SEVO vs CONTROL; #: p=0,01, SEVO vs SHAM.

Tabla 3. Variables hemodinámicas.

VARIABLE	GRUPO	BASAL	PreR	PosR
PAM (mmHg)	CON	101,16 (4,71)	96,5 (5,48)	90,5 (5,2)
	SEVO	73,17 (5,31) * #	89,17 (4,03)	71,5 (8,19)
	SHAM	104 (4,79)	101,5 (10,15)	100,25 (6,9)
FC (latidos/min)	CON	98,5 (5,10)	106,67 (11,36)	112,67 (12,55)
	SEVO	98,83 (5,96)	102,17 (6,99)	112,83 (15,11)
	SHAM	100,75 (7,95)	111,25 (13,36)	105,75 (14,21)
IC (Lmin/m ²)	CON	6,01 (0,65)	5,11 (0,68)	5,23 (0,82)
	SEVO	5,12 (0,53)	4,92 (0,60)	4,47 (0,41)
	SHAM	6,15 (0,68)	5,93 (0,76)	5,8 (0,60)
PCP (mmHg)	CON	16 (1,71)	26,83 (2,00) +	16,5 (0,88) &
	SEVO	11,5 (1,36)	25 (1,21) @	12,5 (1,25)
	SHAM	11,75 (0,25)	10,75 (0,25)	13,75 (0,75)

Los resultados se expresan como media (error típico). PAM: presión arterial media. FC: frecuencia cardíaca. IC: índice cardíaco. PCP: Presión capilar pulmonar. PreR: prerreperusión. PosR: a los 30 minutos post reperusión. CON: grupo control. SEVO: grupo acondicionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo cirugía simulada. *: p=0,004, CON vs SEVO; #: p=0,01, SEVO vs SHAM, +: p=0,01, CON vs SHAM; @: p=0,01, SEVO vs SHAM; &: p=0,01, CON vs SEVO.

▪ Frecuencia cardíaca (FC)

La FC demostró gran estabilidad durante todo el procedimiento en los distintos grupos, sin que se encontrasen diferencias significativas ni entre los valores de cada uno de los grupos, ni entre los grupos (tabla 3, figura 7).

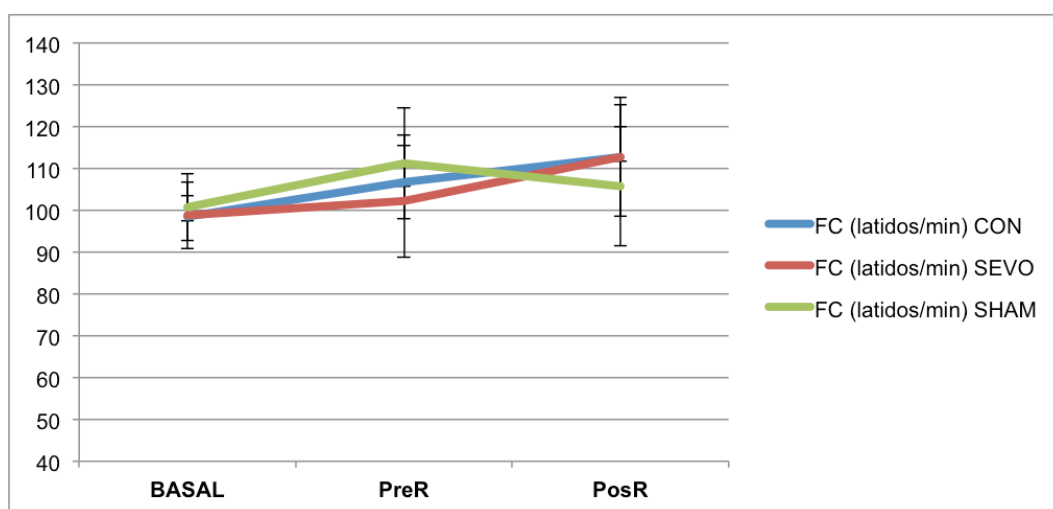


Figura 7. Evolución de la frecuencia cardíaca en los distintos grupos durante el experimento (latidos/minuto). PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

▪ Índice cardíaco (IC)

No se encontraron diferencias en el IC ni cuando se compararon los tres grupos, ni dentro de cada grupo (tabla 3, figura 8).

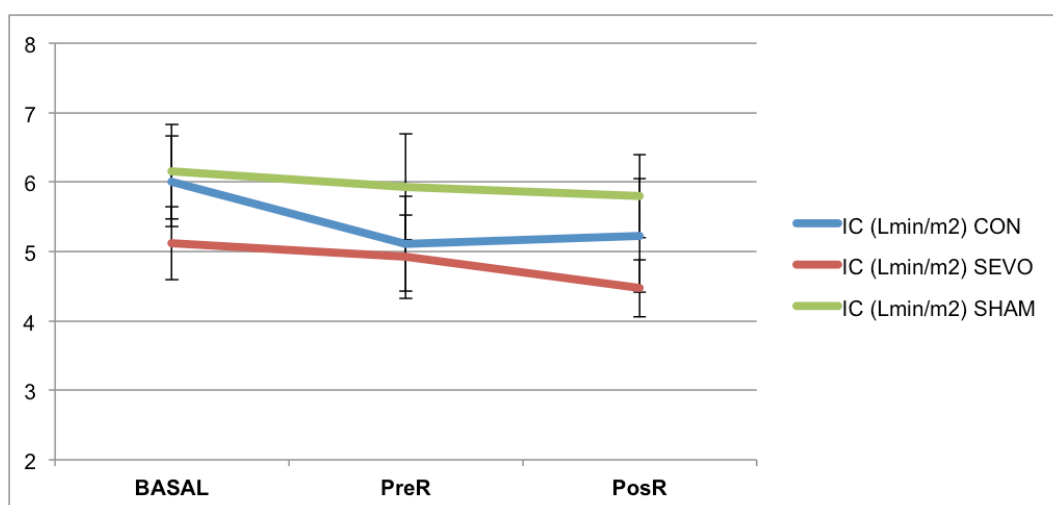


Figura 8. Evolución del índice cardíaco en los distintos grupos durante el experimento (Lmin/m²). PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

▪ Presión capilar pulmonar (PCP)

Se observó un aumento de las presiones capilares pulmonares en el momento pre-reperusión el grupo control con respecto al sham (CON vs SHAM, $p=0,01$) y en el grupo sevoflurano con respecto al grupo sham (SEVO vs SHAM, $p=0,01$). Tras la reperusión, la presión capilar pulmonar en el grupo control fue mayor que en el grupo sevoflurano (CON vs SEVO, $p=0,01$) (tabla 3, figura 9).

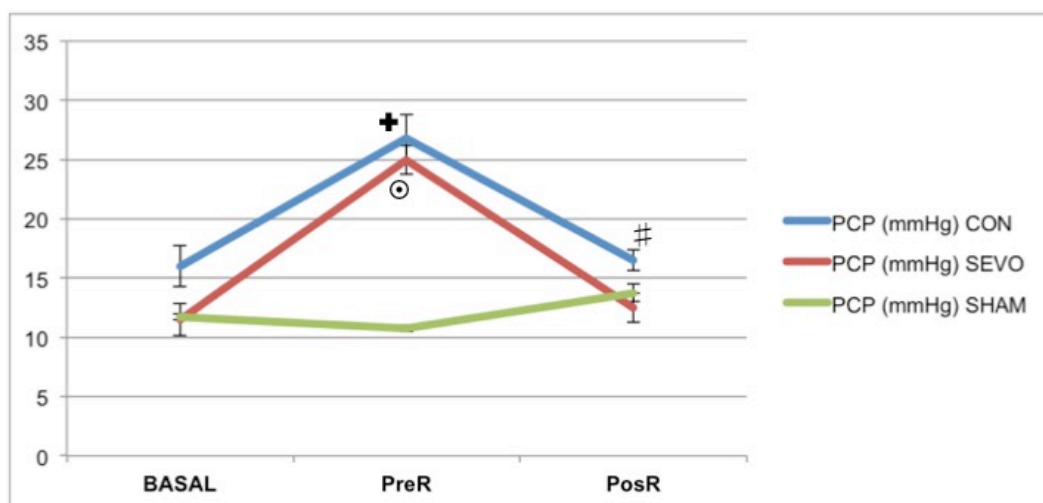


Figura 9. Evolución de la presión capilar pulmonar en los distintos grupos durante el experimento (mmHg). PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham. *: $p=0,01$, CON vs SHAM; ⊙: $p=0,01$, SEVO vs SHAM; #: $p=0,01$, CON vs SEVO.

5.3 Variables gasométricas

▪ Presión arterial de oxígeno (PaO_2)

Aunque se registraron algunas diferencias en los valores de la PaO_2 , éstas no fueron significativas, ni en los valores dentro de cada grupo ni entre los grupos (tabla 4, figura 10).

Tabla 4. Variables gasométricas.

VARIABLE	GRUPO	BASAL	PreR	PosR
PO ₂	CON	361 (72,28)	328,83 (60,15)	357,17 (50,34)
	SEVO	258,83 (44,61)	214,5 (40,32)	262,33 (59,13)
	SHAM	315,25 (77,39)	406,75 (53,87)	431 (43,86)
PCO ₂	CON	37 (2,9)	41 (2,72)	38,83 (2,31)
	SEVO	33,5 (2,23)	40,83 (3,18)	38,83 (3,42)
	SHAM	32,75 (3,19)	46 (9,87)	34,5 (0,28)
pH	CON	7,50 (0,28)	7,44 (0,01)	7,49 (0,02)
	SEVO	7,56 (0,02)	7,49 (0,04)	7,49 (0,05)
	SHAM	7,55 (0,34)	7,42 (0,07)	7,5 (0,02)

Los resultados se expresan como media (error típico). PO₂: Presión arterial de oxígeno. PCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono. PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

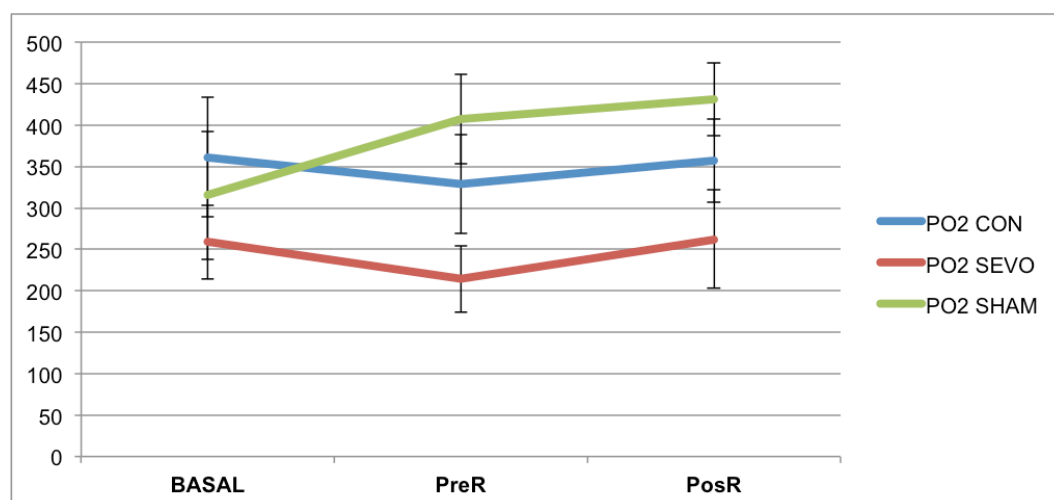


Figura 10. Presión arterial de oxígeno (PO₂, mmHg). PreR: Prerreperusión. PosR: Posreperusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

▪ Presión arterial de dióxido de carbono (PaCO₂)

El registro de los distintos valores de PaCO₂ muestra regularidad durante los distintos procedimientos, sin que se encontrasen diferencias entre los valores de cada grupo o entre los grupos (tabla 4, figura 11).

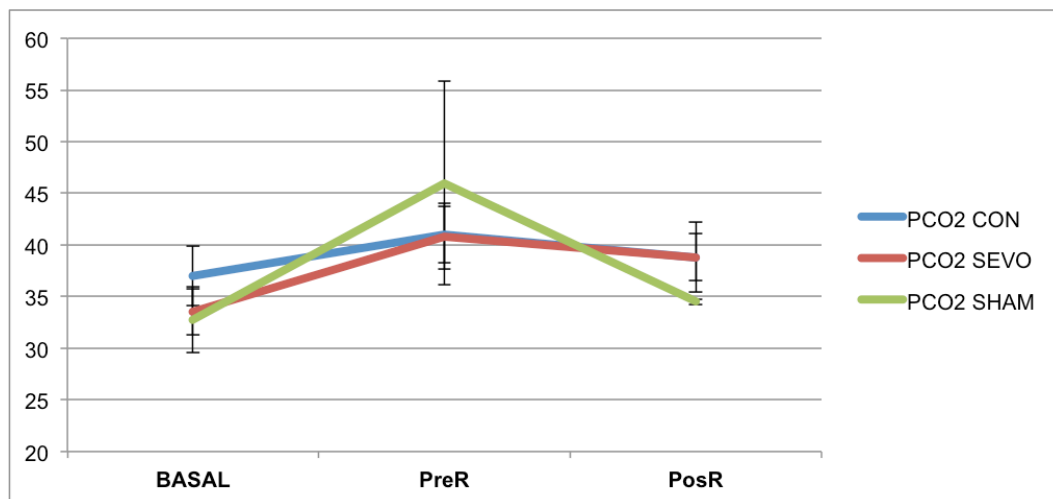


Figura 11. Presión arterial de dióxido de carbono (PCO_2 , mmHg). PreR: Prerperfusión. PosR: Posreperfusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

▪ pH sistémico (pH)

El pH sistémico se mostró estable dentro de los valores fisiológicos durante todos los procedimientos. No se registraron diferencias dentro de cada grupo, ni entre los distintos grupos entre si (tabla 4, figura 12).

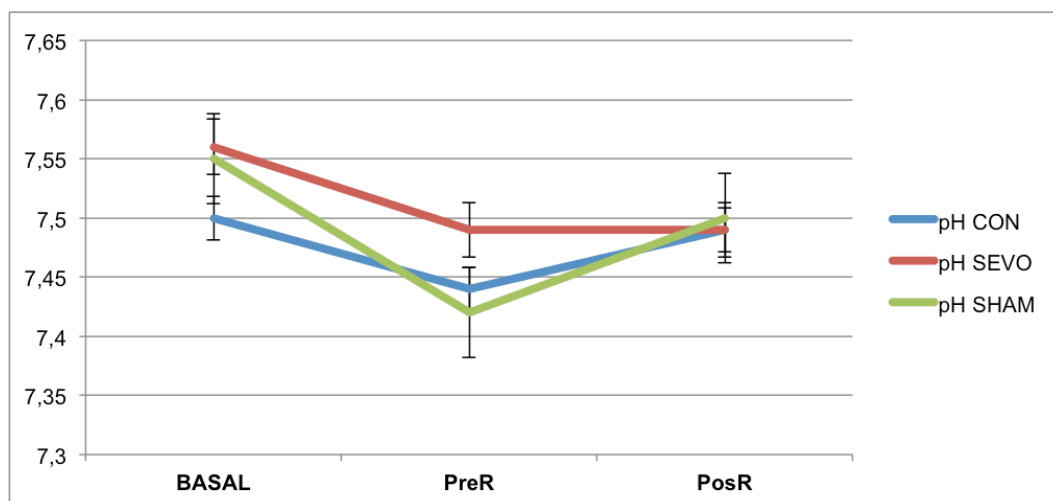


Figura 12. pH sistémico. PreR: Prerperfusión. PosR: Posreperfusión. CON: control. SEVO: Grupo sevoflurano. SHAM: grupo sham.

5.4 Determinación histopatológica de mediadores de daño pulmonar

5.4.1 Tinción con hematoxilina-eosina

5.4.1.1 Estudio descriptivo

La descripción general de los hallazgos de las muestras del estudio implica la de la estructura normal del tejido pulmonar periférico, en zonas de predominio alveolar, en los que se identifica en grado variable, según las muestras y el experimento correspondiente, células inflamatorias, edema y congestión capilar. En las zonas menos alteradas, se observan campos de parénquima pulmonar periférico de características morfológicas habituales en la arquitectura pulmonar. Se distinguen algunos núcleos de neumocitos y capilares alveolares en los tabiques, así como algunos capilares de pequeño calibre con hematíes y células inflamatorias mononucleares en su interior. Estos hallazgos son generalizados en las muestras del grupo sham (figura 13).

En varias muestras del grupo control es posible observar parénquima pulmonar periférico con predominio de tabiques alveolares en los que se aprecia congestión vascular capilar y elementos inflamatorios de tipo mononuclear, con presencia de numerosos hematíes intraalveolares en forma de hemorragia intraalveolar (figuras 14 y 15).

En la mayoría de las preparaciones del grupo preconditionado con sevoflurano y en algunas del grupo control, se observan situaciones intermedias, con espacios alveolares delimitados por tabiques alveolares

con núcleos de neumocitos y algún capilar en el que se observan signos de discreta congestión. En algunos campos se observa la presencia de hematíes en la luz alveolar y, ocasionalmente, células macrofágicas en la luz del alvéolo (figuras 16, 17 y 18).

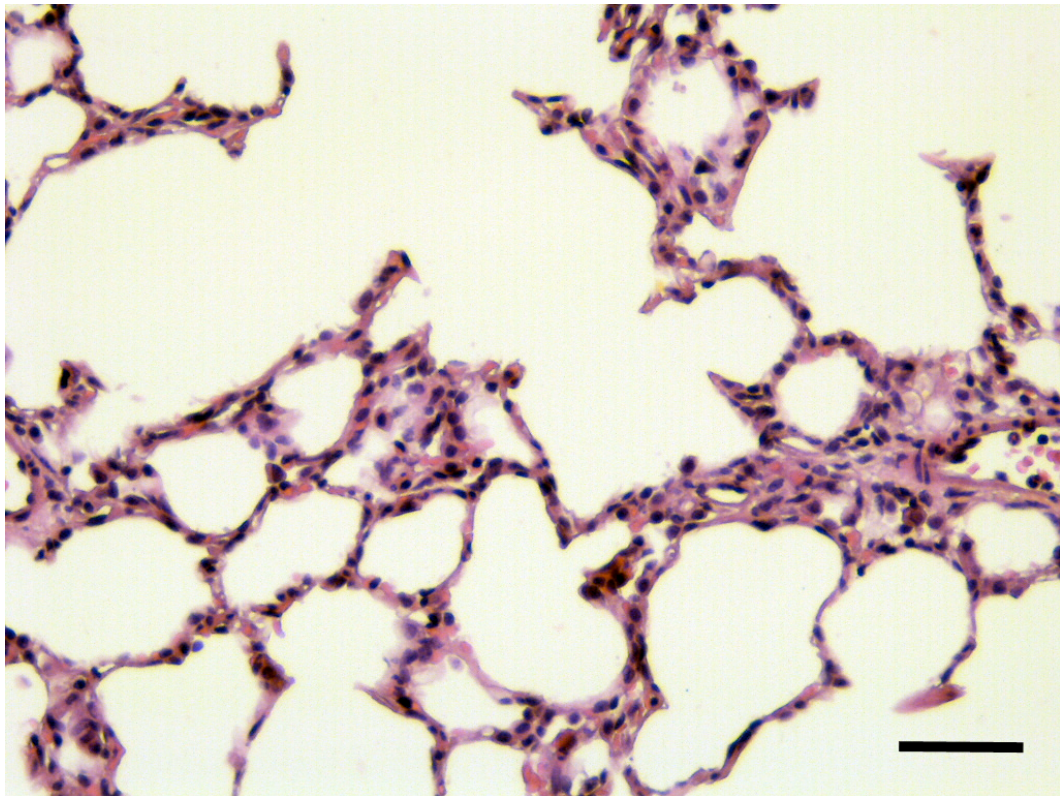


Figura 13. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo sham (20x). Campo de parénquima pulmonar periférico identificándose preferentemente tabiques alveolares que delimitan luces alveolares de características morfológicas habituales con presencia de núcleos de neumocitos y capilares alveolares en los tabiques. A la derecha de la imagen, capilar con hematíes y células inflamatorias mononucleares en su interior (barra de escala = 50 μ).

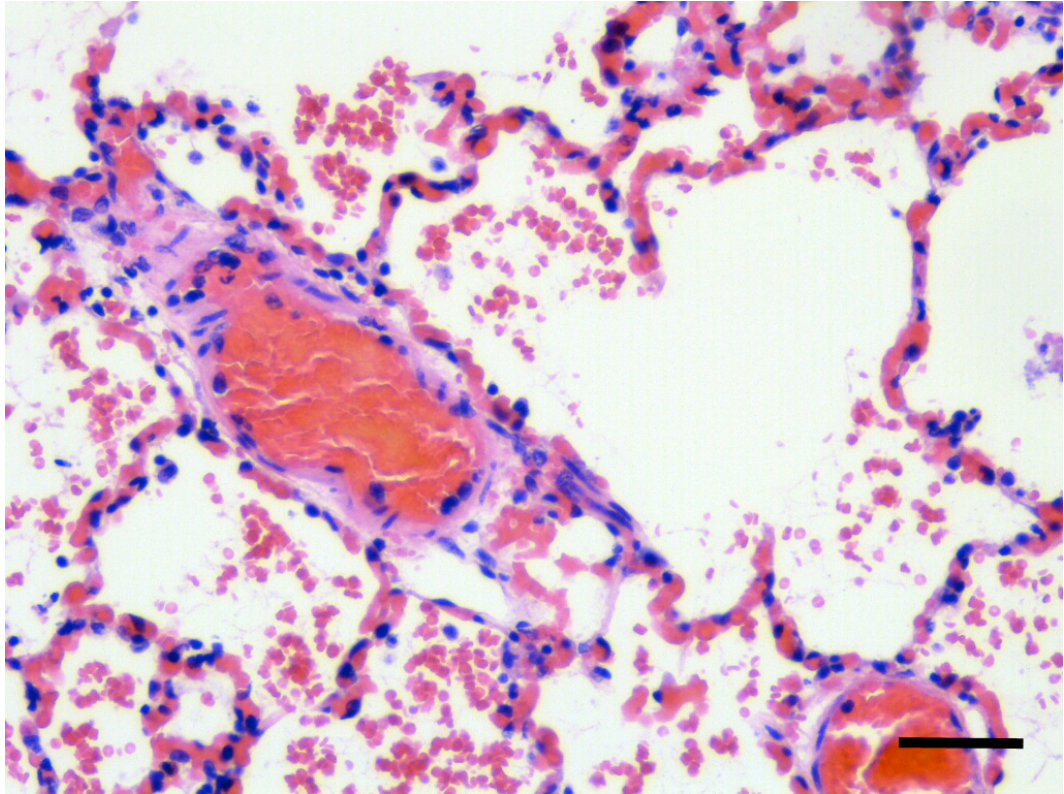


Figura 14. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo control (20x). Campo de parénquima pulmonar con presencia de dos vasos de pequeño calibre, marcadamente congestivos, tabiques alveolares en los que se observa congestión vascular capilar y numerosos hematíes intraalveolares en forma de hemorragia intraalveolar (barra de escala = 50 μ).

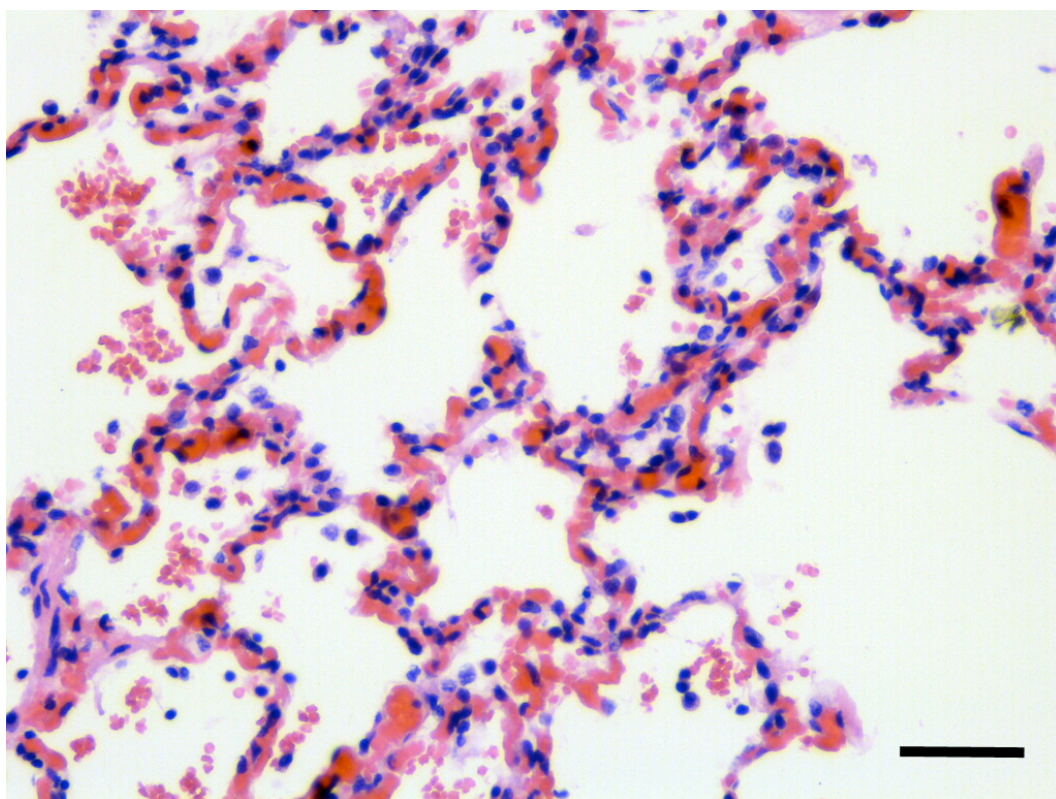


Figura 15. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo control (20x). Parénquima pulmonar periférico con predominio de tabiques alveolares con marcada congestión capilar con elementos inflamatorios de tipo mononuclear, como histiocitos descamados en la luz alveolar, se observan numerosos hematíes alveolares en forma de hemorragia intraalveolar (barra de escala = 50 μ).

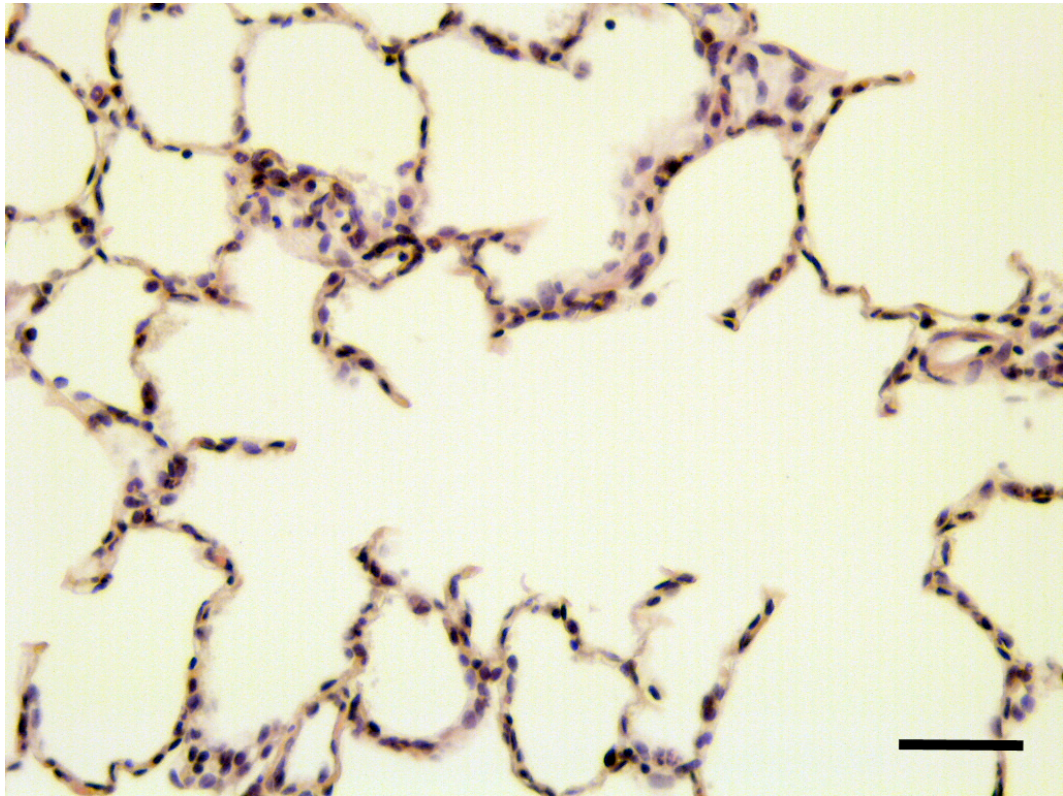


Figura 16. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo sevoflurano (20x). Campo de parénquima pulmonar periférico con espacios alveolares delimitados por tabiques alveolares con núcleos de neumocitos y algún capilar de características morfológicas habituales (barra de escala = 50 μ).

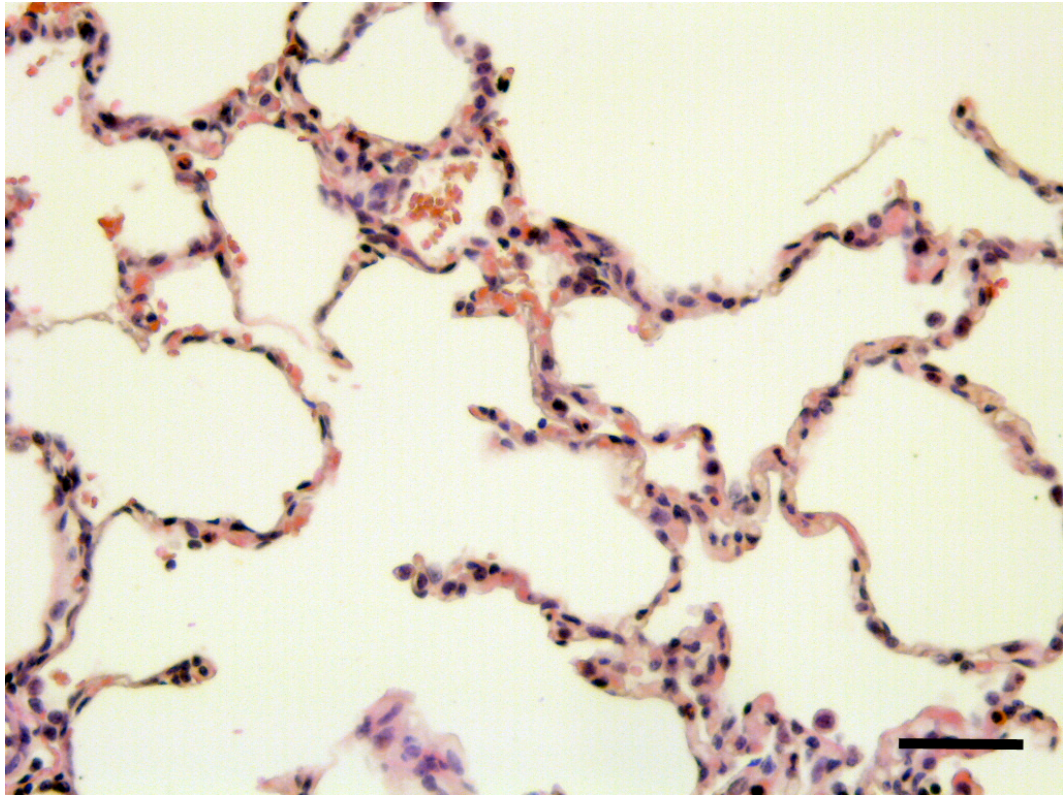
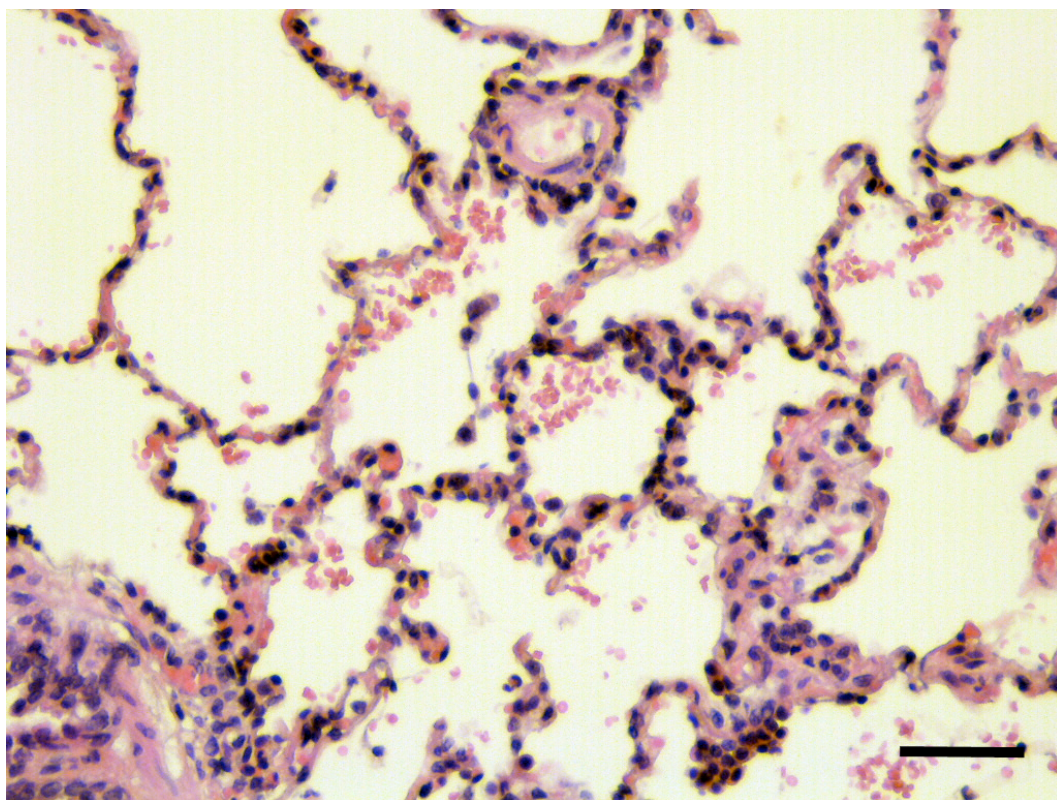
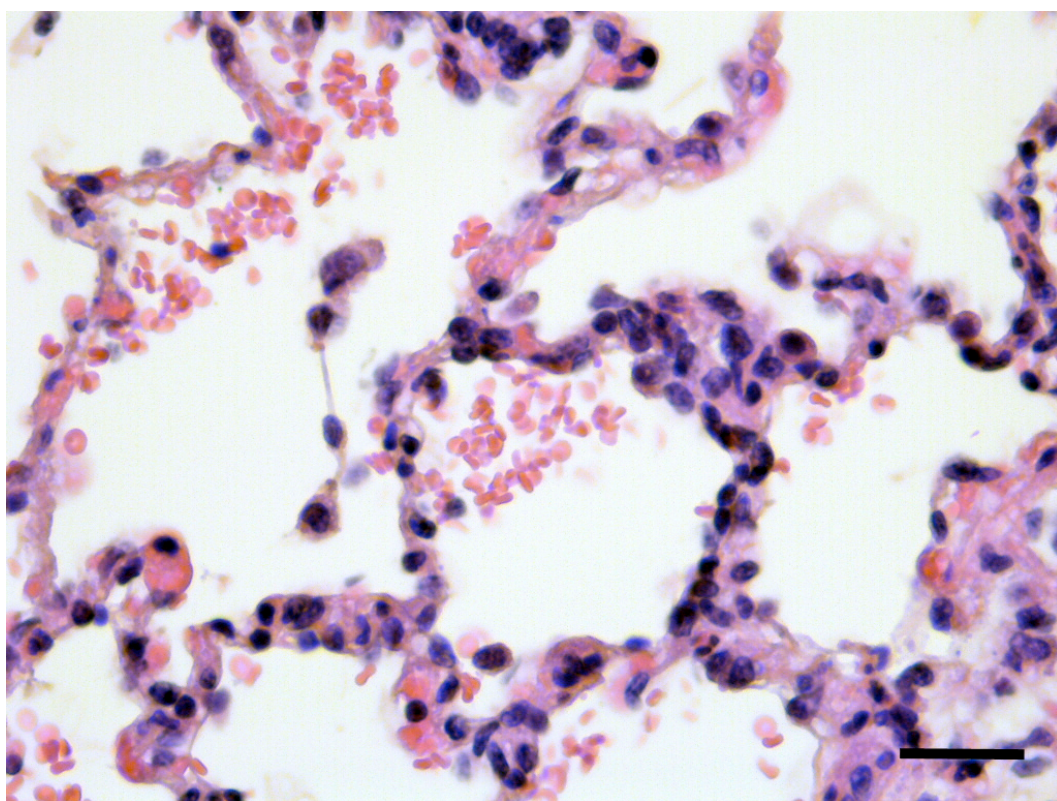


Figura 17. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo sevoflurano (20x). Parénquima pulmonar periférico constituido por tabiques alveolares, en los que se observan núcleos de neumocitos y capilares que en su interior muestran hematíes (barra de escala = 50 μ).



A



B

Figura 18. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido pulmonar del grupo sevoflurano. Parénquima pulmonar periférico a 20x (A, barra de escala = 50 μ) y 40x (B, barra de escala = 30 μ), en el que se identifican tabiques alveolares con discreta congestión capilar, observándose hematíes en la luz alveolar y algunas células macrofágicas en la luz del alvéolo.

5.4.1.2 Análisis semicuantitativo

En la tabla 5 se presenta la distribución de frecuencias, y sus porcentajes dentro del grupo correspondiente, de los parámetros de grado de inflamación y de grado de infiltración por los diferentes tipos de elementos celulares. La IR pulmonar indujo en el tejido pulmonar un aumento en la infiltración de MM a los 30 minutos tras la reperusión en el grupo CONTROL, (CON vs SHAM, $p=0,021$). Este aumento en la infiltración de MM fue menor en los pulmones sometidos a sevoflurano que en aquellos en los que no se realizó preconditionamiento (SEVO vs CONTROL, $p=0,014$) (figura 19). No se encontraron diferencias significativas entre la infiltración de MM en los tejidos pulmonares de los grupos SEVO y SHAM. No se observaron diferencias entre los grupos respecto al grado de inflamación global ni al de infiltración por linfocitos o leucocitos (tabla 5, figura 19).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre edema y congestión de los tejidos pulmonares de los distintos grupos del estudio (tabla 6).

Tabla 5. Determinación histopatológica del daño pulmonar por IR mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión (inflamación y tipos celulares inflamatorios).

GRUPO	Grado	Inflamación		MM		Linfocitos		PMN	
		N	P	N	P	N	P	N	P
CON	Nada	0	0,0%	0	0,0%	5	83,3%	4	66,7%
	Leve	4	66,7%	4	66,7%	1	16,7%	2	33,3%
	Moderado	2	33,3%	2	33,3%	0	0,0%	0	0,0%
	Severo	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
SEVO	Nada	1	16,7%	4	66,7%	1	16,7%	5	83,3%
	Leve	4	66,7%	2	33,3%	5	83,3%	1	16,7%
	Moderado	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Severo	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
SHAM	Nada	2	50,0%	3	75,0%	2	50,0%	4	100,0%
	Leve	2	50,0%	1	25,0%	2	50,0%	0	0,0%
	Moderado	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Severo	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo. PMN: polimorfonucleares. CON: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo cirugía simulada.

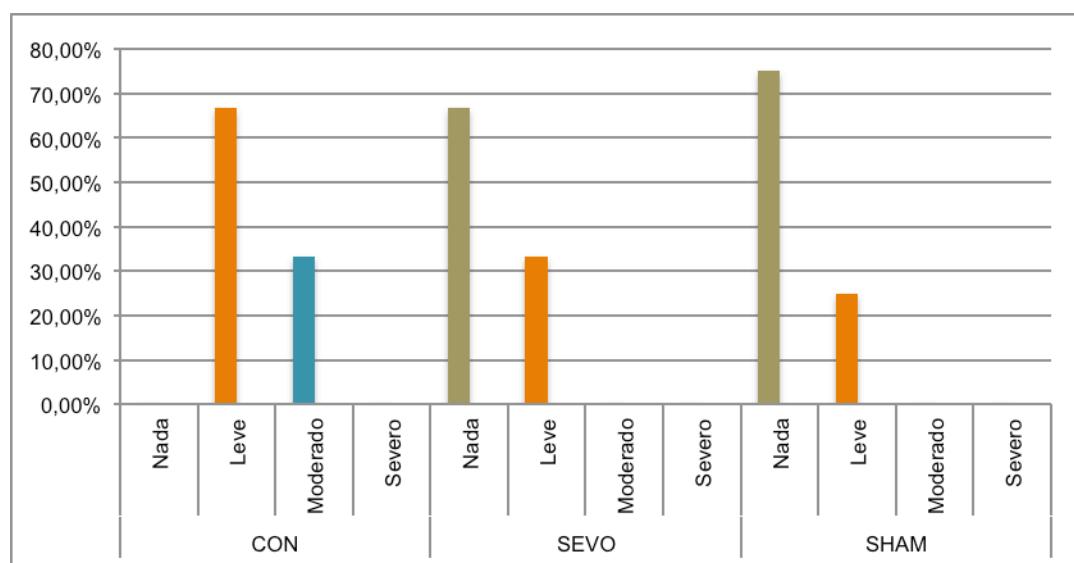


Figura 19. Gráfica de distribución de frecuencias de monocitos-macrófagos. CON: grupo control. SEVO: grupo sevoflurano. SHAM: grupo de cirugía simulada. CON vs SHAM, $p=0,021$; SEVO vs SHAM, $p=0,014$.

Tabla 6. Determinación histopatológica del daño pulmonar por IR mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión (edema intersticial y congestión capilar).

GRUPO	Grado	Edema		Congestión	
		N	P	N	P
CON	Nada	1	16,7%	1	16,7%
	Leve	2	33,3%	2	33,3%
	Moderado	3	50,0%	2	33,3%
	Severo	0	0,0%	1	16,7%
SEVO	Nada	3	50,0%	3	50,0%
	Leve	3	50,0%	2	33,3%
	Moderado	0	0,0%	1	16,7%
	Severo	0	0,0%	0	0,0%
SHAM	Nada	3	75,0%	3	75,0%
	Leve	1	25,0%	1	25,0%
	Moderado	0	0,0%	0	0,0%
	Severo	0	0,0%	0	0,0%

N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo. PMN: polimorfonucleares. CON: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo cirugía simulada.

5.4.2 Técnicas inmunohistoquímicas

5.4.2.1 Presencia de macrófagos (CD-68)

5.4.2.1.1 Estudio descriptivo

Se estudian numerosos campos de tejido pulmonar tras la realización de la técnica inmunohistoquímica para CD-68. Se observa parénquima pulmonar con la arquitectura general preservada, con

diferentes grados de inflamación, edema y congestión. Destaca la presencia de algunos macrófagos teñidos de manera citoplasmática granular fuerte. Se observan en localización intravascular (figuras 20 y 21), intersticio alveolar (figura 22) e intraalveolar (figura 23).

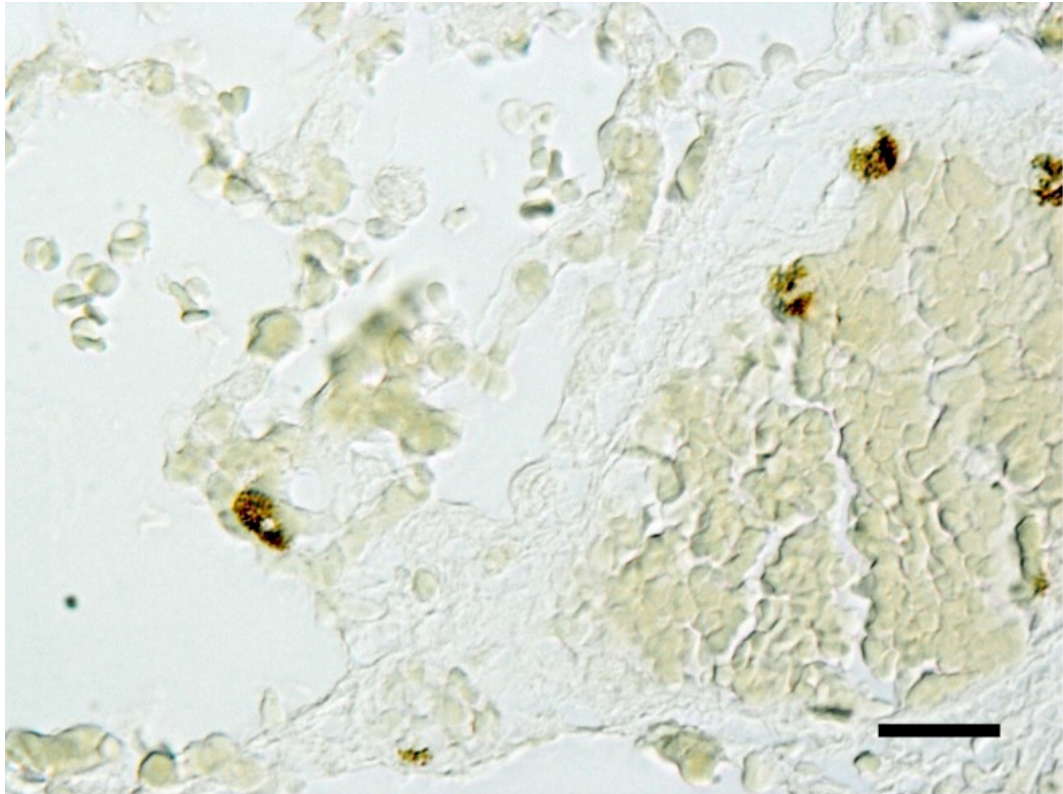


Figura 20. Tinción de CD-68 en grupo control (60x). Vaso de pequeño calibre, conteniendo abundantes hematíes, donde se observa la presencia de tres macrófagos (barra de escala = 10 μ).

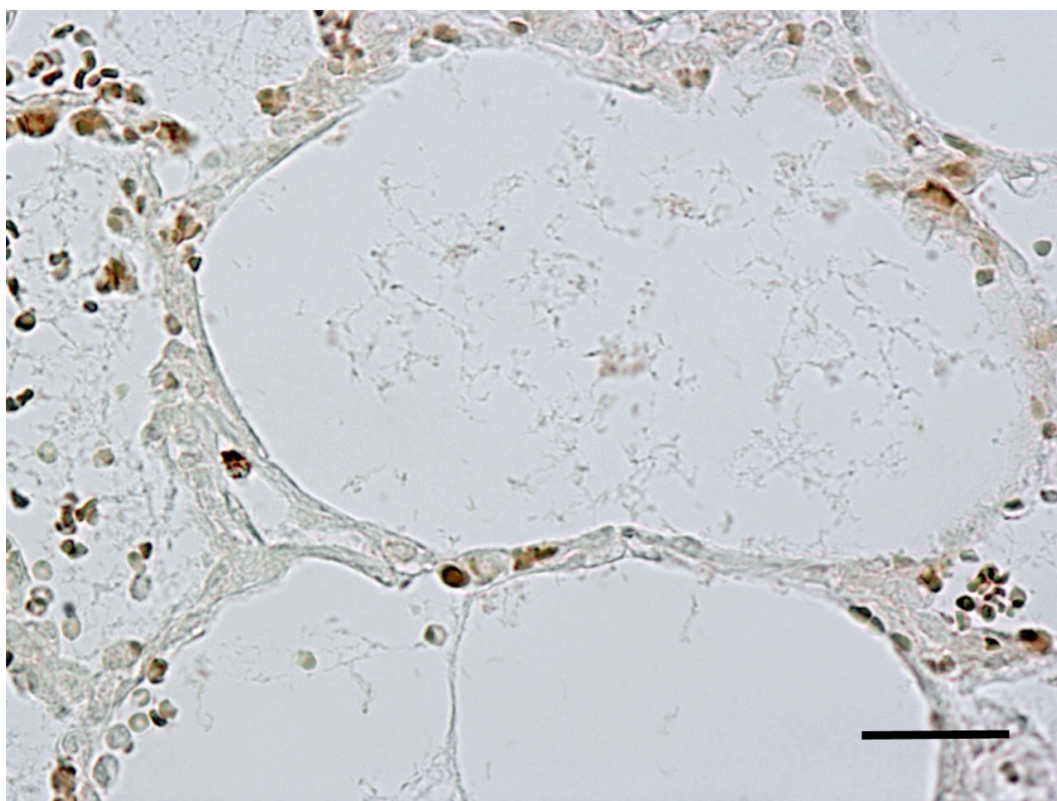


Figura 21. Tinción de CD-68 en grupo sevoflurano (40x). En esta imagen se observa parénquima pulmonar con intersticio alveolar, en el que parece identificarse una luz capilar en la que se observa una célula con tinción granular fuerte de localización citoplasmática, que podría corresponder a un macrófago (barra de escala = 30 μ).

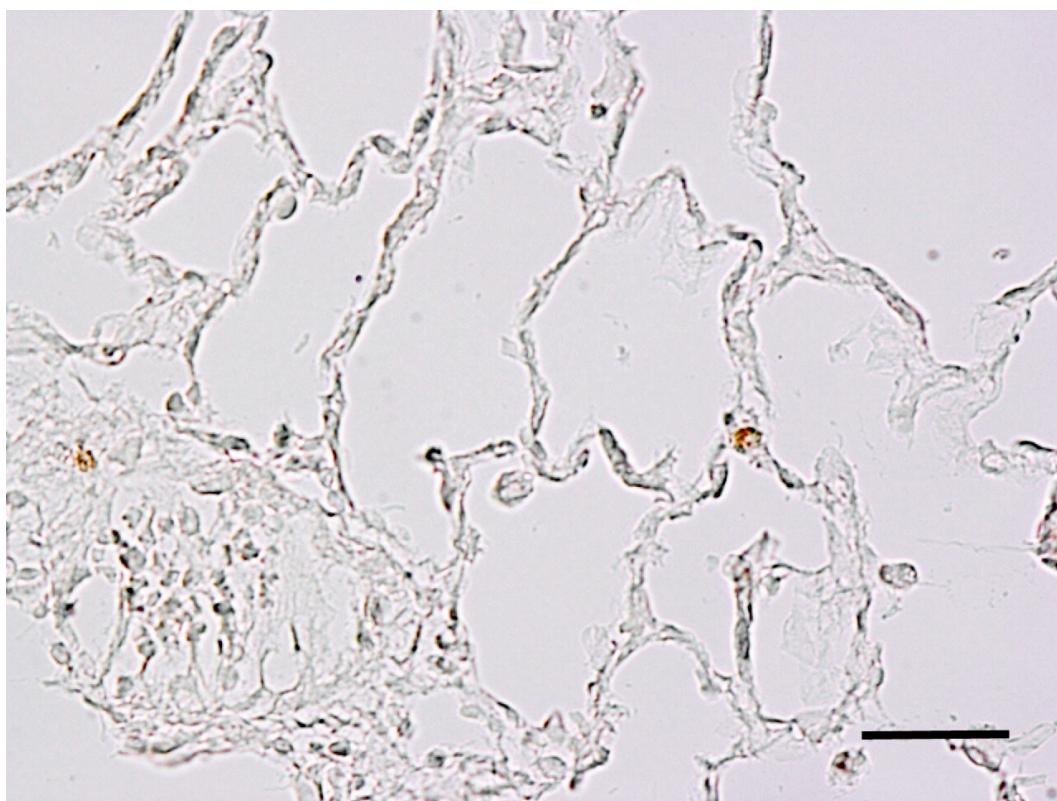


Figura 22. Tinción de CD-68 en grupo sevoflurano (40x). Se observa parénquima pulmonar con intersticio alveolar. En la parte derecha, una célula con tinción moderada, granulada, citoplasmática que podría corresponder a un macrófago alveolar (barra de escala = 30 μ).

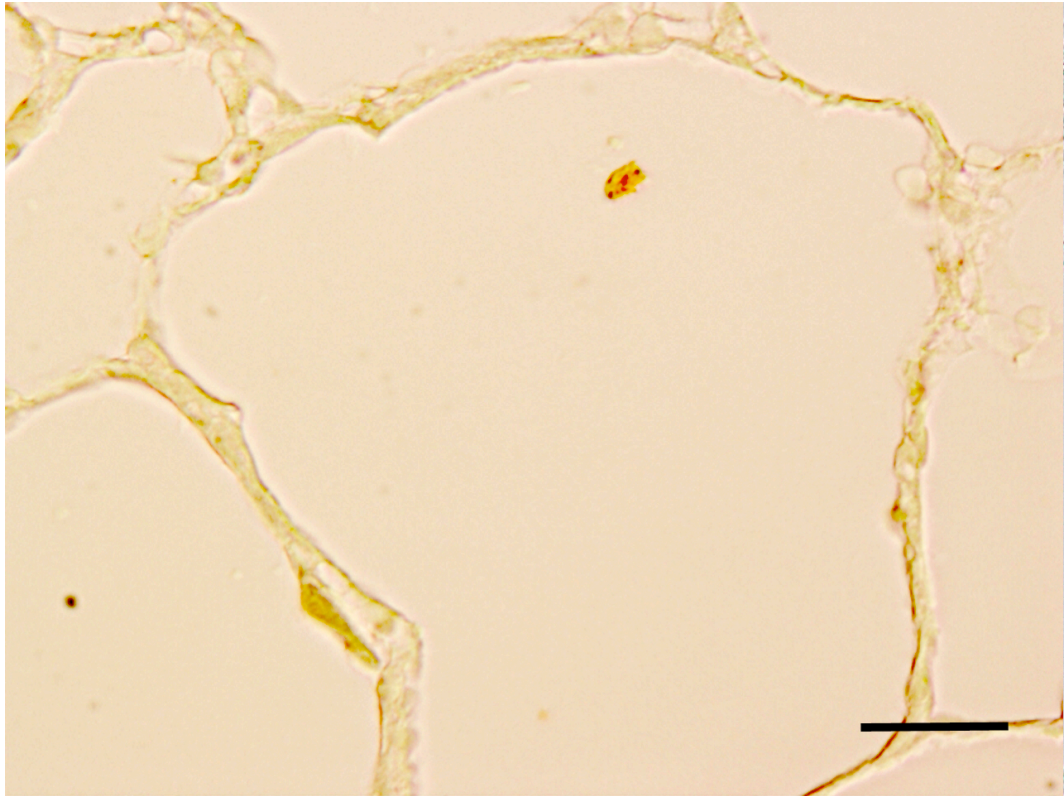


Figura 23. Campo de tejido pulmonar periférico (40x), con presencia de tabiques alveolares y alvéolos. En el interior de un alvéolo se identifica lo que podría ser macrófago con tinción citoplasmática, granular, moderada, para CD-68 (barra de escala = 30 μ).

5.4.2.1.2 Análisis cuantitativo

La IR pulmonar indujo en los pulmones un aumento en la expresión de células con tinción CD68+ extraídas a los 30 minutos tras la reperusión en los animales del grupo control, con respecto al grupo simulado SHAM [15,7(3,97) vs 0(0), CONTROL vs SHAM, $p=0,011$]. En los pulmones del grupo SEVO se observa una discreta elevación de células CD68+ con respecto al grupo simulado SHAM, a los que no se sometió a IR [2,00 (0,75) vs 0 (0), SEVO vs SHAM, $p=0,008$]. Esta elevación fue significativamente menor en los pulmones sometidos a sevoflurano que en aquellos en los que no se realizó el preconditionamiento (control) [15,7(3,97) vs 2,00(0,75), CONTROL vs SEVO, $p=0,01$] (tabla 7, figura 24).

Tabla 7. Tinción inmunohistoquímica CD68 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	CD68
Control	15,7 (3,97) @ +
SEVO	2,00 (0,75) #
Sham	0,00 (0,00)

Los resultados se expresan como media (error típico). Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. @: $p=0,01$, CON vs SHAM; #: $p=0,08$, SEVO vs SHAM; +: $p=0,01$, CON vs SEVO.

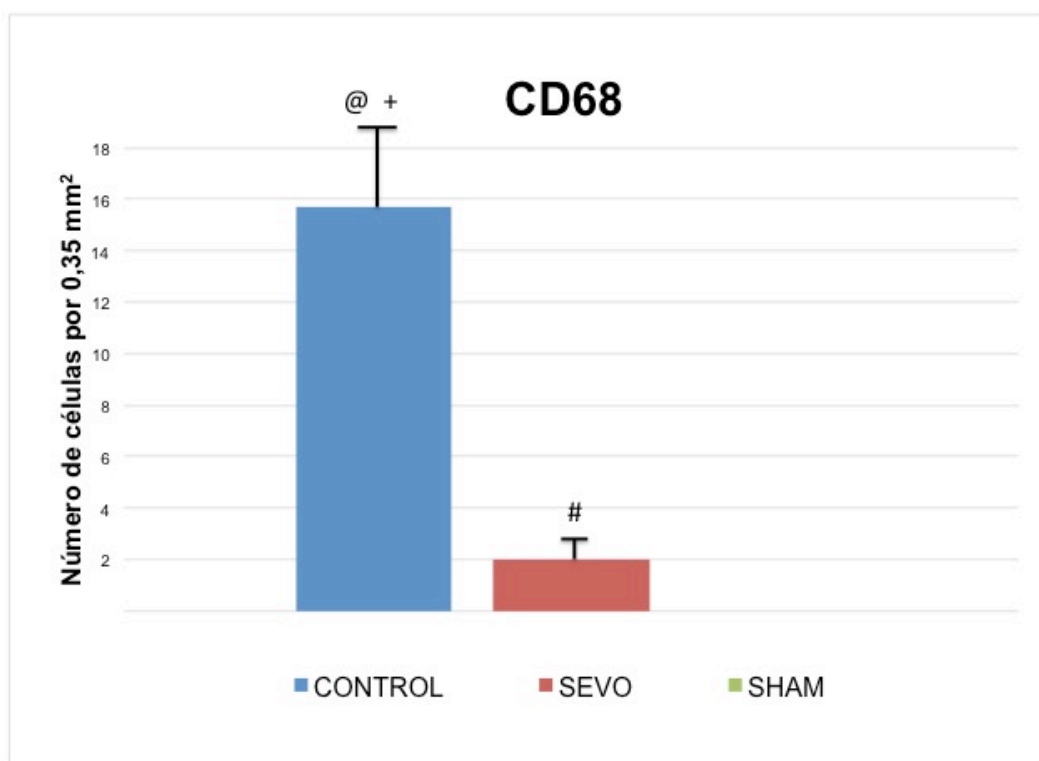


Figura 24. Tinción inmunohistoquímica de CD68 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión. Los resultados se expresan como media y error típico del número de células encontradas en 10 campos. Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. @: $p=0,01$, CON vs SHAM; #: $p=0,08$, SEVO vs SHAM; +: $p=0,01$, CON vs SEVO.

5.4.2.2 MCP-1

5.4.2.2.1 Estudio descriptivo

Se estudian numerosos campos de tejido pulmonar tras la realización de la técnica inmunohistoquímica para MCP-1. Se observa parénquima pulmonar con la arquitectura general preservada, con diferentes grados de inflamación, edema y congestión. Destaca la tinción citoplasmática de algunos macrófagos, de manera granular, intensa

(figura 25) y de algunas células neumocitarias, que expresan tinción citoplasmática granular e intensa (figura 26). Se confirmó la ausencia de expresión de MCP-1 en el grupo SHAM (figura 27).

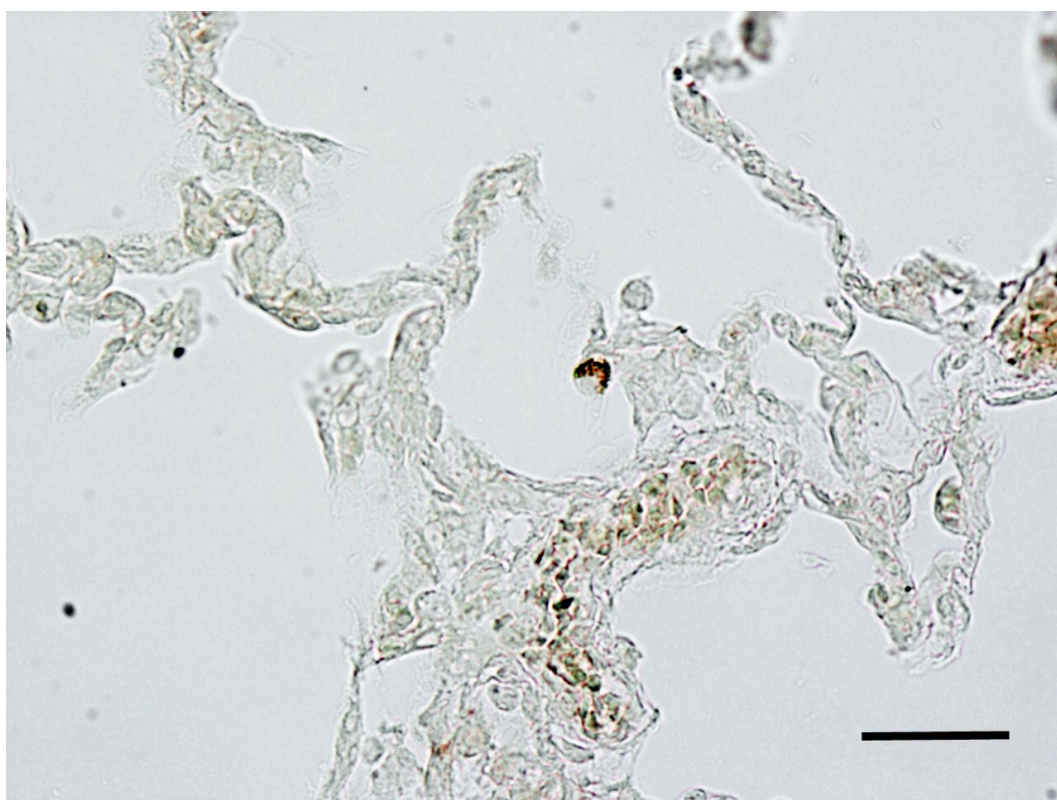


Figura 25. Tinción de MCP-1 en grupo control (40x). Se observa parénquima pulmonar periférico con tabiques alveolares y luces alveolares, en las que se observa una célula que podría corresponder a un macrófago con tinción citoplasmática, fuerte, granular (barra de escala = 30 μ).

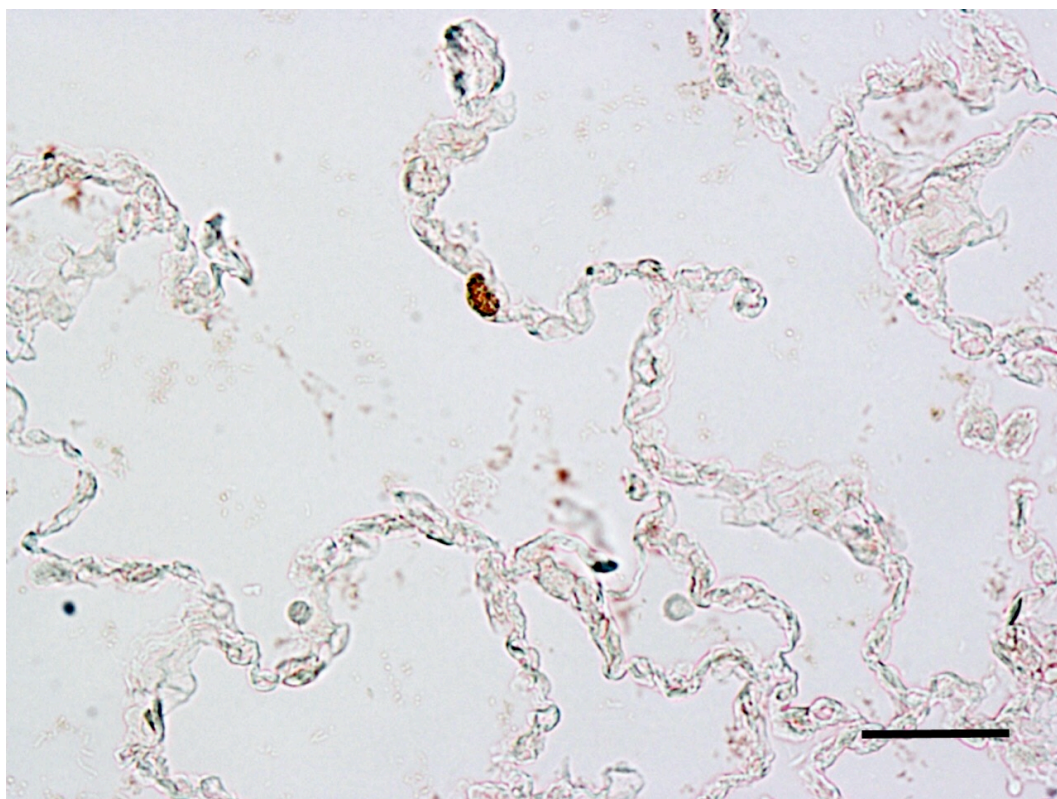


Figura 26. Tinción de MCP-1 en grupo sevoflurano (40x). Campo de tejido pulmonar periférico, con presencia de tabiques alveolares en los que se identifican núcleos de neumocitos, observándose un núcleo neumocitario teñido de manera granular fuerte para MCP-1 (barra de escala = 30 μ).

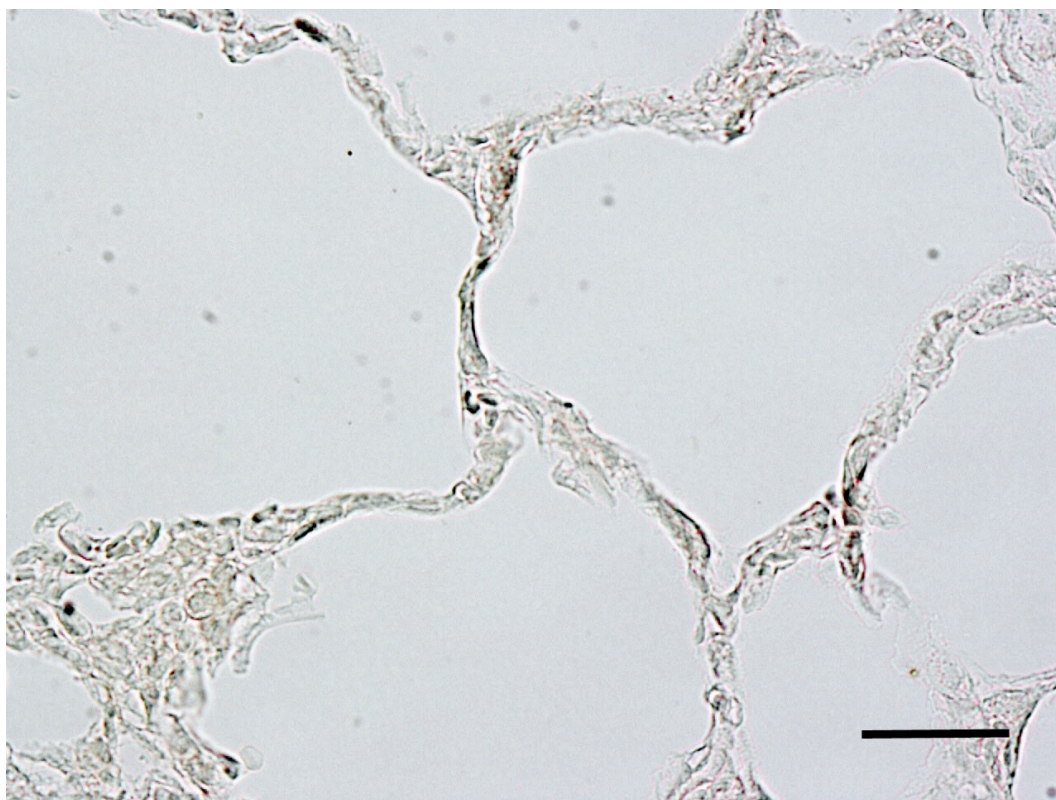


Figura 27. Tinción de MCP-1 en grupo SHAM (40x). Campo de tejido pulmonar periférico, con presencia de tabiques alveolares y alvéolos, en la que no se identifica tinción celular por MCP-1 (barra de escala = 30 μ).

5.4.2.2.2 Análisis cuantitativo

La IR pulmonar indujo en los pulmones un aumento de la expresión de células con tinción MCP-1+ extraídas a los 30 minutos tras la reperusión en los animales del grupo control, con respecto al grupo simulado SHAM [14,6(4,34) vs 0,25(0,25), CONTROL vs SHAM, $p=0,013$]. En los pulmones del grupo SEVO se observa una mínima elevación de células MCP-1+ con respecto al grupo simulado SHAM, sin que exista una diferencia significativa. Sin embargo, esta elevación fue significativamente menor en los pulmones sometidos a sevoflurano que en aquellos en los que no se realizó el preconditionamiento (control) [14,6(4,34) vs

2,67(1,27), CONTROL vs SEVO, $p=0,028$] (tabla 8, figura 28).

Tabla 8. Tinción inmunohistoquímica MCP-1 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	MCP-1
Control	14,6 (4,33) # +
SEVO	2,66 (1,27)
Sham	0,25 (0,25)

Los resultados se expresan como media (error típico). Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. #: $p=0,013$, CON vs SHAM; +: $p=0,028$, CON vs SEVO.

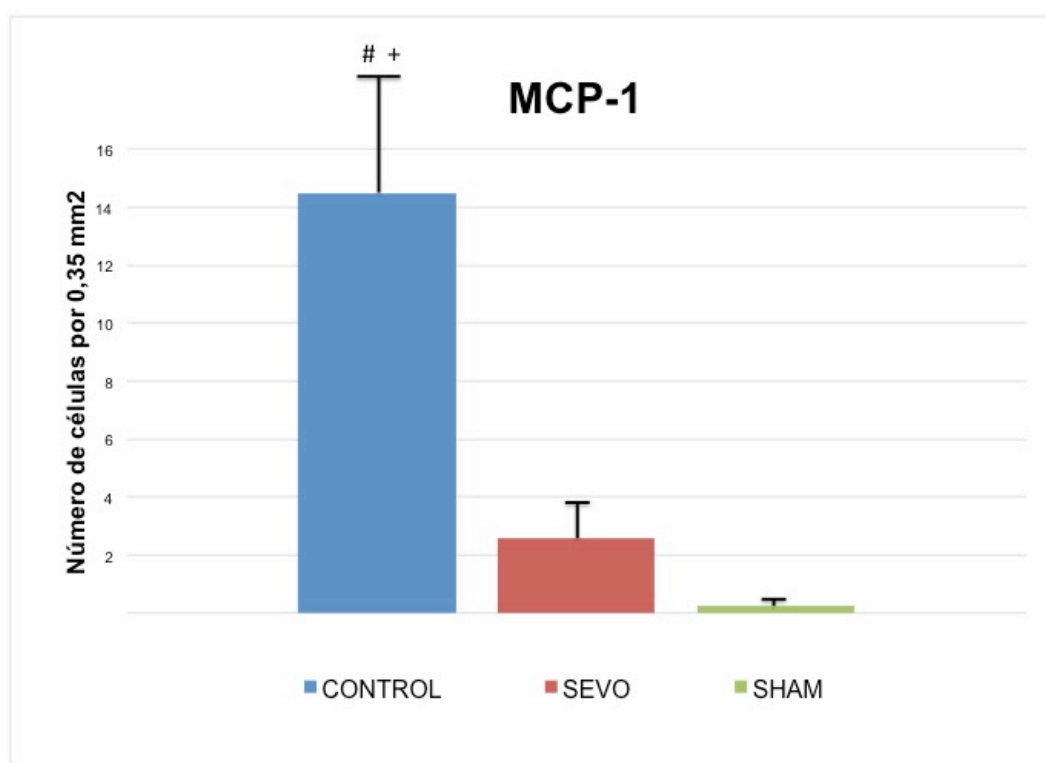


Figura 28. Representación gráfica de tinción inmunohistoquímica de MCP-1 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión. Los resultados se expresan como media y error típico del número de células encontradas en 10 campos. Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. #: $p=0,013$, CON vs SHAM; +: $p=0,028$, CON vs SEVO.

5.4.2.3 Caspasa 9

5.4.2.3.1 Estudio descriptivo

Se estudian numerosos campos de tejido pulmonar tras la realización de la técnica inmunohistoquímica para caspasa 9. Se observa parénquima pulmonar con la arquitectura general preservada, con diferentes grados de inflamación, edema y congestión. Destaca, con frecuencia, la tinción de células neumocitarias en las paredes alveolares de tipo difuso y predominio citoplasmático, con intensidad fuerte-moderada (figuras 29 y 30). Con menos frecuencia se observa tinción débil citoplasmática de algún macrófago en la luz alveolar (figuras 30) y la tinción nuclear de células neumocitarias aisladas en la pared del alveolo (figura 31).

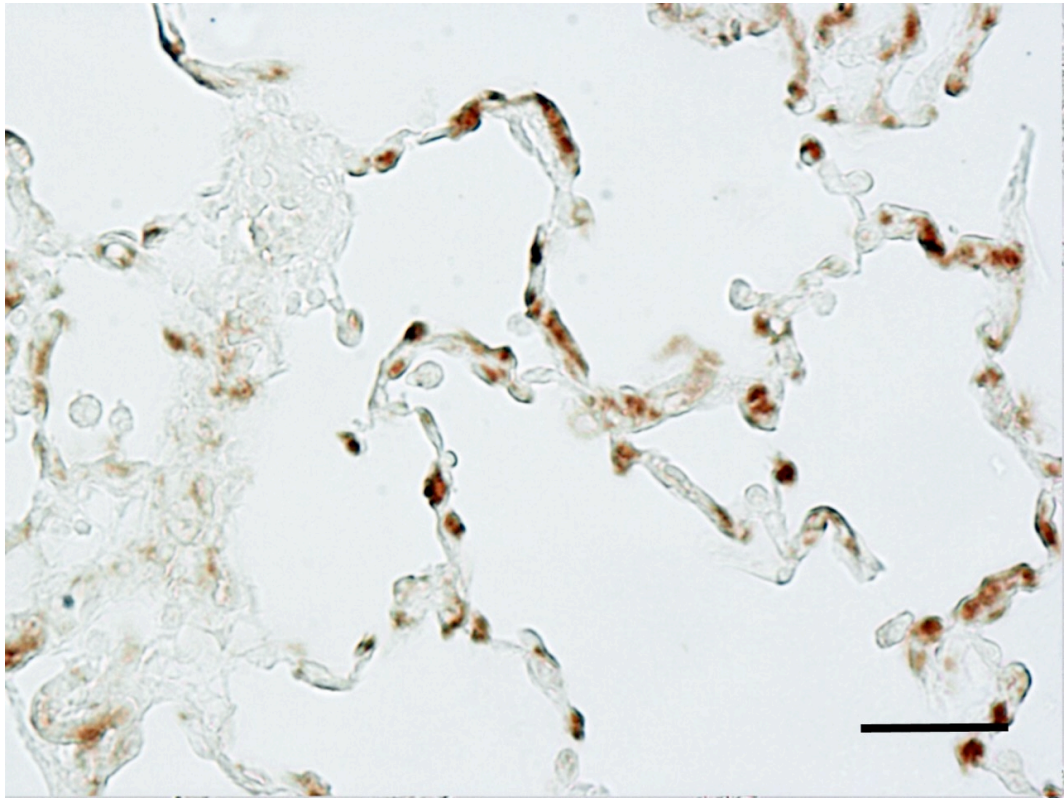


Figura 29. Tinción de Caspasa 9 en grupo control (40x). Se identifica tejido parenquimatoso pulmonar periférico, en el que se identifican paredes alveolares con núcleos de células neumocitarias y un vaso de pequeño calibre. En las paredes alveolares se observa una tinción positiva de intensidad moderada-fuerte difusa, predominantemente citoplasmática, en células neumocitarias (barra de escala = 30 μ).

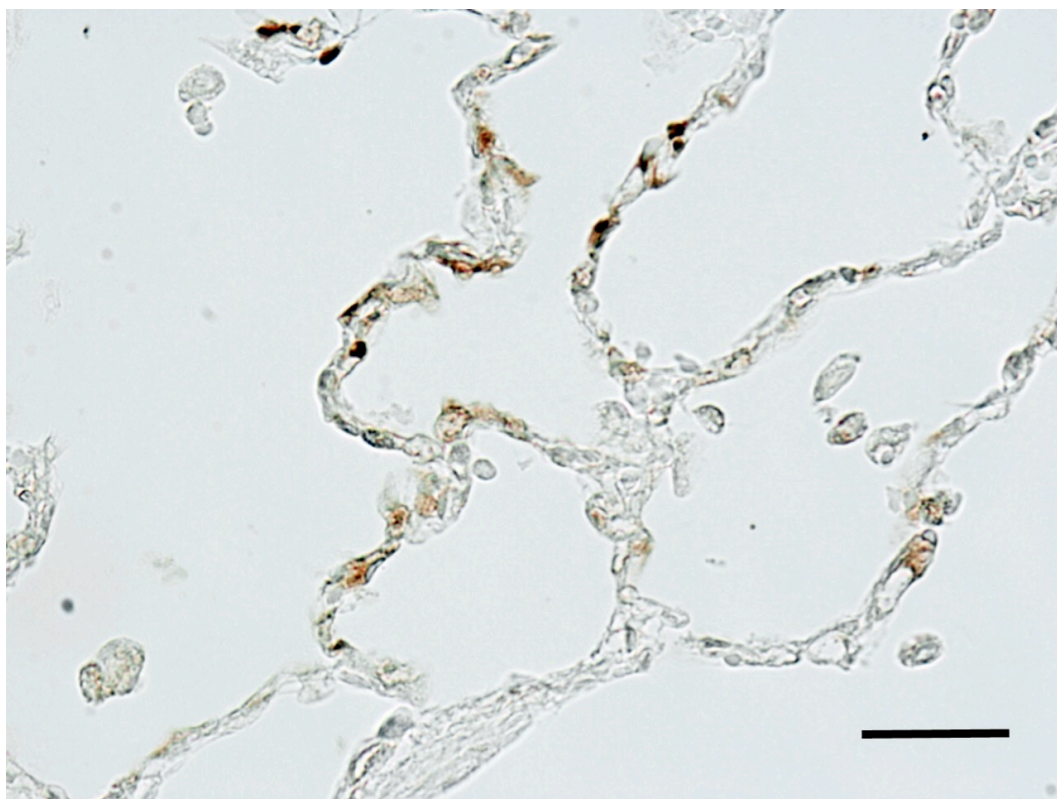


Figura 30. Tinción de caspasa 9 en grupo control (40x). Se observa tinción citoplasmática de los neumocitos de las paredes alveolares, junto con tinción débil citoplasmática de alguno de los macrófagos descamados en la luz alveolar (barra de escala = 30 μ).

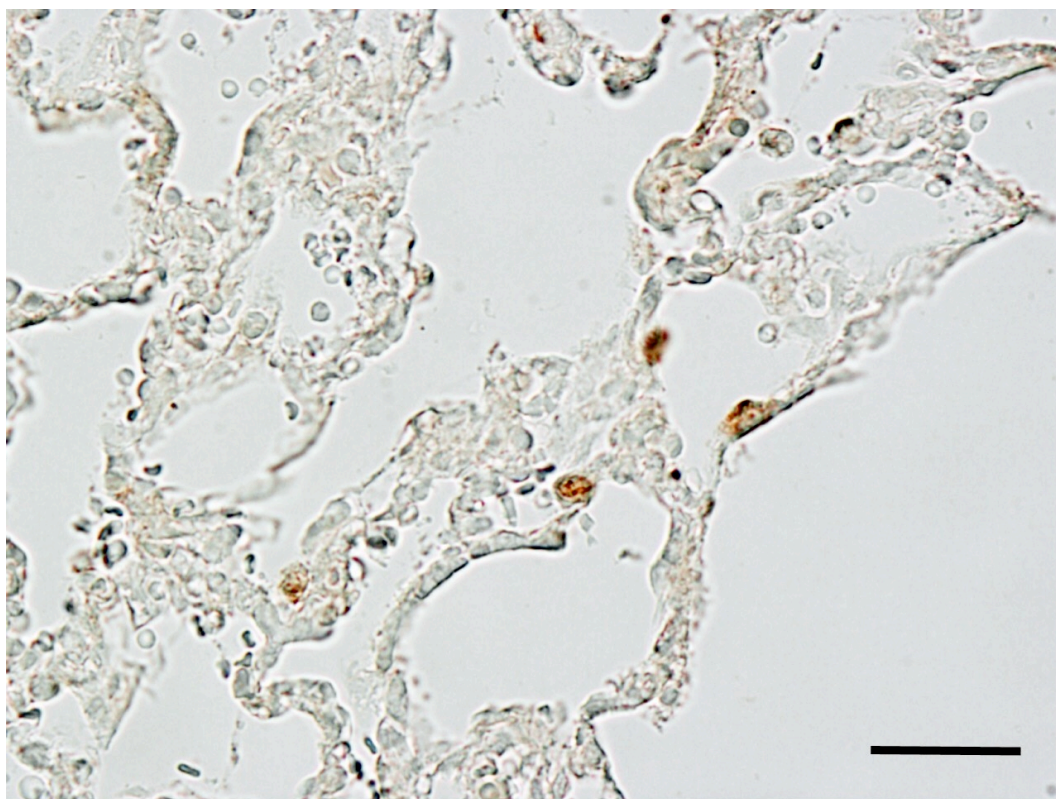


Figura 31. Tinción de caspasa 9 en grupo control (40x). Se observa tejido pulmonar periférico con presencia paredes alveolares y alvéolos, con alguna zona de colapso alveolar. Destaca la presencia de algún macrófago intraalveolar y la positividad nuclear de algún neumocito aislado en la pared del alvéolo (barra de escala = 30 μ).

5.4.2.3.2 Análisis semicuantitativo

En la tabla 9 se presenta la distribución de frecuencias, y sus porcentajes dentro del grupo correspondiente, del grado de expresión inmunohistoquímica de caspasa 9. La IR pulmonar indujo en el tejido pulmonar un aumento en la expresión de caspasa 9 a los 30 minutos tras la reperusión en el grupo CONTROL, (CON vs SHAM, $p=0,005$). Este aumento en la expresión de caspasa 9 fue menor en los pulmones sometidos a sevoflurano que en aquellos en los que no se realizó

precondicionamiento (SEVO vs CONTROL, $p=0,018$). No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de caspasa 9 en los tejidos pulmonares de los grupos SEVO y SHAM (tabla 9).

Tabla 9. Análisis semicuantitativo de la expresión inmunohistoquímica de caspasa 9 a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	Grado	Caspasa 9	
		N	P
CON	0	0	0%
	1	5	83,3%
	2	1	16,7%
SEVO	0	4	66,7%
	1	2	33,3%
	2	0	0,0%
SHAM	0	4	100,0%
	1	0	0,0%
	2	0	0,0%

Grado: 0 = Ausencia de tinción, 1 = tinción < 50% de las células, 2 = tinción > 50% de las células. N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo. PMN: polimorfonucleares. CON: grupo control. SEVO: grupo precondicionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo cirugía simulada.

5.4.2.4 BCL-2

5.4.2.4.1 Estudio descriptivo

Se estudian numerosos campos de tejido pulmonar tras la realización de la técnica inmunohistoquímica para caspasa BCL-2. Se observa parénquima pulmonar con la arquitectura general preservada,

con diferentes grados de inflamación, edema y congestión. Destaca la tinción citoplasmática de células neumocitarias de tipo granular (figuras 32 y 33). Con menos frecuencia, se observa tinción citoplasmática, granular y de fuerte intensidad de células de estirpe macrofágica (figura 34).

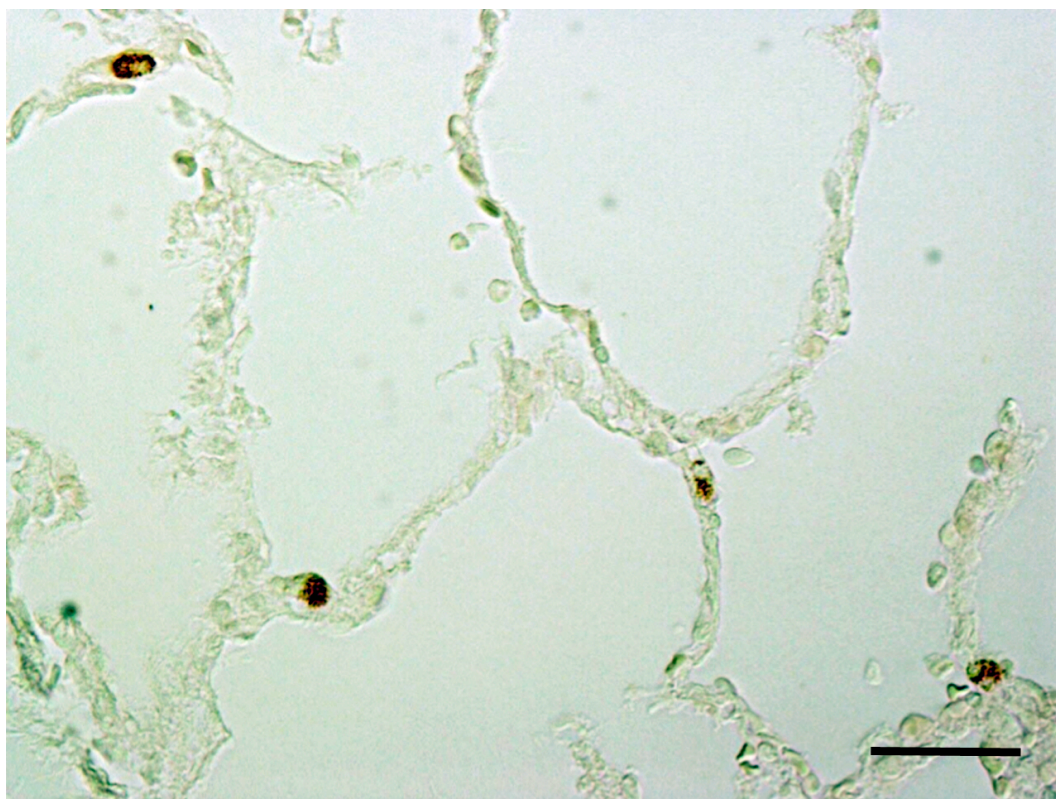


Figura 32. Tinción de BCL-2 en grupo control (40x). Se observa parénquima pulmonar periférico, constituido por paredes alveolares en las que se diferencian núcleos de células neumocitarias, y en la luz alveolar la presencia de algún hematíe. Se identifican 4 células neumocitarias con tinción positiva de tipo granular, citoplasmática (barra de escala = 30 μ).

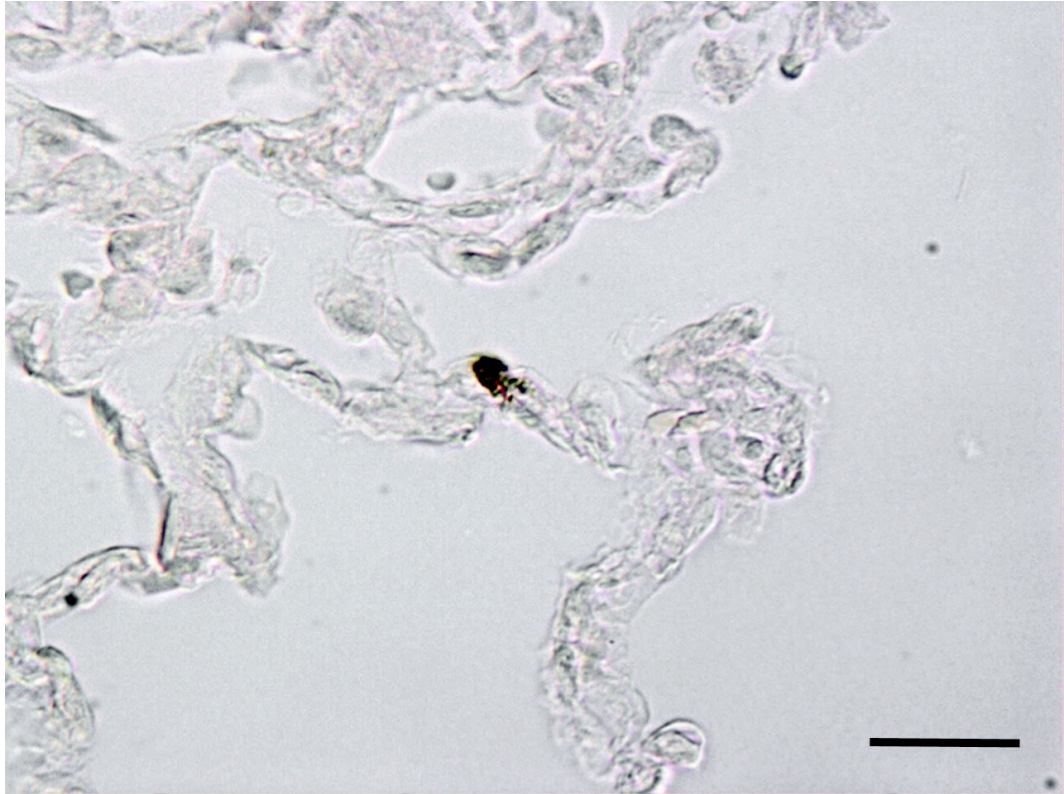


Figura 33. Tinción en BCL-2 en grupo sevoflurano (40x). Se observa tejido pulmonar periférico, con presencia de paredes alveolares en las que se diferencian núcleos de células neumocitarias. Se identifica una célula neumocitaria con tinción positiva granular, citoplasmática (barra de escala = 30 μ).

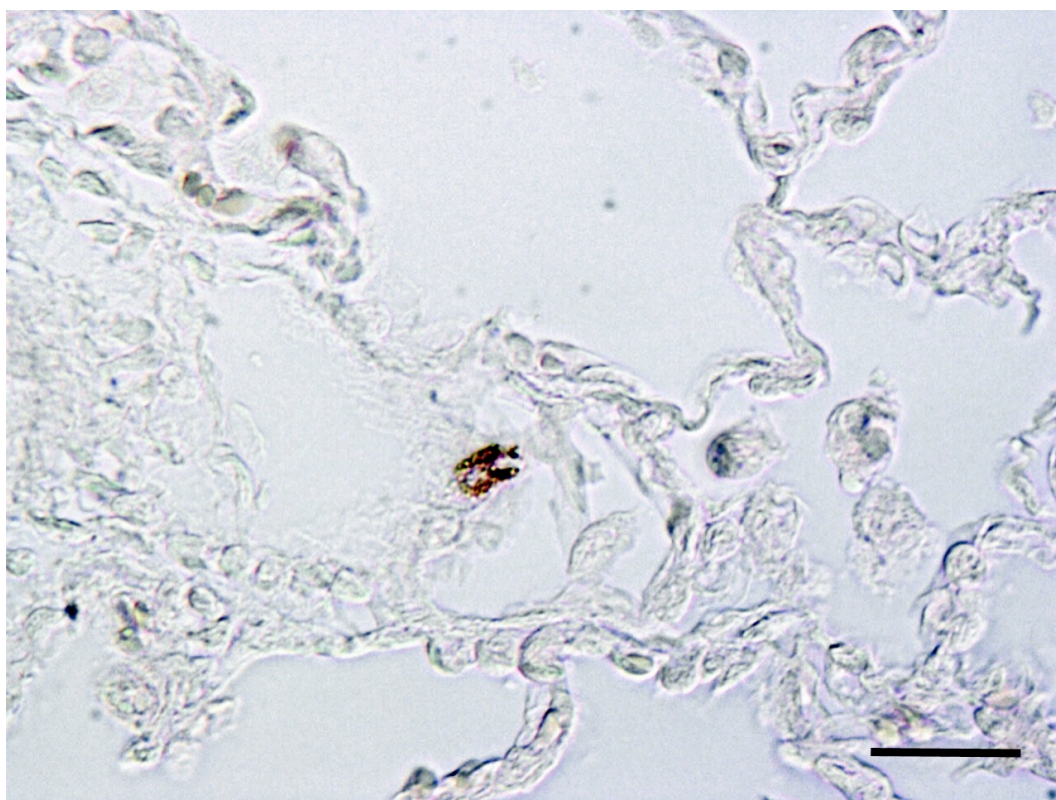


Figura 34. Tinción en BCL-2 en grupo sevoflurano (40x). Se observa tejido pulmonar periférico, con presencia de paredes alveolares en las que se diferencian núcleos de células neumocitarias. Se identifica una célula que podría ser de estirpe macrofágica, con tinción positiva granular, citoplasmática (barra de escala = 30 μ).

5.4.2.4.2 Análisis cuantitativo

La IR pulmonar indujo en los pulmones un aumento de la expresión de células con tinción BCL-2+ extraídas a los 30 minutos tras la reperusión en los animales precondicionados del grupo SEVO, con respecto al grupo control [0,40(0,40) vs 14,00(4,59), CONTROL vs SEVO, $p=0,007$]. Lo mismo sucede con los pulmones del grupo SEVO con respecto al grupo simulado SHAM [14,00(4,59) vs 1,00(1,00), SEVO vs SHAM, $p=0,018$]. En los pulmones del grupo SHAM se observa una discreta elevación de células Bcl-2+ con respecto al grupo CONTROL, sin

que exista una diferencia significativa (tabla 10, figura 35).

Tabla 10. Tinción IHQ BCL-2 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	BCL-2
Control	0,40 (0,40)
SEVO	14,00 (4,59) #, +
Sham	1,00 (1,00)

Los resultados se expresan como media (error típico). Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. #: $p=0,007$, SEVO vs CON; +: $p=0,018$, SEVO vs SHAM.

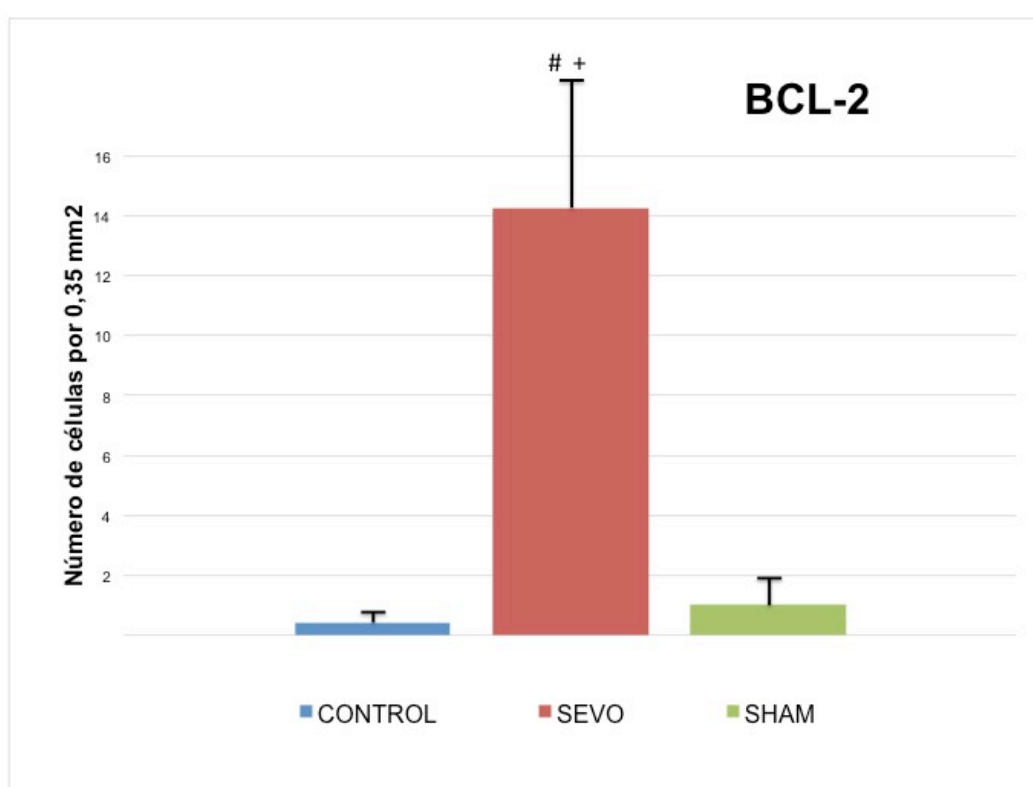


Figura 35. Representación gráfica de tinción inmunohistoquímica de Bcl-2 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión. Los resultados se expresan como media y error típico del número de células encontradas en 10 campos. Control: grupo control. SEVO: grupo preconditionamiento con sevoflurano. SHAM: grupo simulado. #: $p=0,007$, SEVO vs CON; +: $p=0,018$, SEVO vs SHAM.

6 DISCUSIÓN

En nuestro trabajo estudiamos el papel del sevoflurano en el daño pulmonar por isquemia-reperfusión (LIRI, del inglés *lung ischemia reperfusion injury*), demostrando sus propiedades protectoras mediante la disminución de la expresión de mediadores de la inflamación y la apoptosis a nivel histológico e inmunohistoquímico, en un modelo *in vivo* de autotrasplante pulmonar porcino.

La lesión por IR en el caso del pulmón tiene especial interés, ya que durante mucho tiempo se pensó que tanto la doble circulación como la presencia de oxígeno en los alvéolos podrían conferirle mayor resistencia al desarrollo de lesiones inducidas por isquemia que otros órganos (5). No hay duda de que el oxígeno alveolar ayuda a mantener el metabolismo aerobio y prevenir la hipoxia (89-91), lo que obliga a diferenciar los mecanismos del estrés oxidativo durante la isquemia o en condiciones de hipoxia para entender bien la fisiopatología de la lesión. Se ha observado, en un modelo experimental canino, que el aumento en la resistencia y permeabilidad vasculares pulmonares tras un mismo periodo de isquemia-reperfusión (oclusión de vasos pulmonares) o de hipoxia-reventilación (ventilación pulmonar con nitrógeno 95% + dióxido de carbono 5% sin pinzamiento vascular) es similar, induciendo el mismo grado de disfunción pulmonar (92). Estos resultados han modificado la idea inicial de protección pulmonar frente la isquemia.

Tras la publicación de los estudios en corazones de perros de los equipos de Reimer y Murry (62-63), en la década de los 80 del siglo

pasado, se describió por primera vez el concepto de preconditionamiento isquémico. Reimer, con la intención de demostrar la disminución progresiva de los niveles de ATP tras la instauración de varios episodios cortos de isquemia, se sorprendió al observar que, si bien tras el primer episodio se detectaba una disminución del ATP, episodios subsiguientes no implicaban una disminución significativa. En contra de lo que se había publicado previamente por el equipo de Geft, que defendían que varios episodios isquémicos de corta duración seguidos podrían tener un efecto acumulativo que podría producir un infarto agudo (93), parecía que precisamente lo que hacían era “preparar” al miocardio ante posteriores agresiones de mayor intensidad. Basándose en el trabajo de Reimer, Murry muestra en su estudio que una serie de cuatro períodos de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de perfusión ayudaban al cardiomiocito a adaptarse rápidamente a la isquemia, de modo que tras 40 minutos de un nuevo periodo isquémico se conseguía disminuir el tamaño de los infartos hasta en un 25%. Posteriormente se descubrió que los efectos protectores iban más allá. Además de limitar el tamaño del infarto prevenía la aparición de arritmias, disminuía el aturdimiento miocárdico y aceleraba la recuperación de la función cardíaca tras la isquemia (64). Resultados similares se obtuvieron cuando el preconditionamiento isquémico se aplicaba en tejido hepático (94), renal (95), neurológico (96), intestinal (97) o a extremidades (98).

Establecido el potencial de preconditionamiento isquémico para proteger tejidos y órganos del daño por isquemia-reperfusión, no cesaron

los esfuerzos en la búsqueda de fármacos que actuaran al mismo nivel de señales intracelulares y que obtuvieran una adaptación celular similar. Por fin, con las primeras publicaciones sobre los efectos cardioprotectores de los anestésicos halogenados (99), Cason y colaboradores (65) introducen el concepto de preconditionamiento anestésico cardíaco, demostrando que la exposición a isoflurano previa a la isquemia activaba un mecanismo protector del miocardio. Este grupo de agentes volátiles parecía gozar de características que producían un comportamiento sobre los tejidos similar al del preconditionamiento isquémico anteriormente descrito, denominado *preconditioning-like*.

Los mecanismos precisos de la protección por halogenados siguen sin conocerse bien. Aparte de sus efectos anti-isquémicos, el halotano parece proteger la función contráctil e integridad estructural tras la parada cardíaca, de lo que se deduce que debe existir algún mecanismo protector independiente de la optimización en el balance entre el aporte y la demanda de oxígeno a los tejidos, justificada por los cambios hemodinámicos. Además, halotano, enflurano y desflurano demostraron reducir el daño miocárdico cuando se administraron durante la perfusión tras una oclusión coronaria prolongada o parada cardíaca (66).

Desde entonces, se han publicado numerosos estudios que confirman el efecto antiinflamatorio y antiapoptótico de los gases halogenados a nivel de los miembros (100), cerebral (101), hepático (74), e intestinal (76). A nivel pulmonar, la información sobre los mecanismos celulares y moleculares es poca. En un principio, algunos trabajos

resultaron contradictorios. En algunos casos, como consecuencia del modelo experimental, como Kotani y colaboradores, quienes en estudios posteriores publican resultados opuestos (102-103) o Takala (104), que interpreta erróneamente la modulación del NO como un aumento en la actividad inflamatoria, se determinó una mayor respuesta inflamatoria pulmonar durante la ventilación mecánica asociada al uso de halogenados. Posteriormente, en un modelo animal de ALI por ventilación mecánica en conejos, el sevoflurano consiguió disminuir la expresión de mediadores inflamatorios, el edema y los cambios en la arquitectura pulmonar (105), confirmando hallazgos previos en modelos animales con isoflurano (83,78), halotano (79) o sevoflurano (80). El equipo de Suter, además, ha confirmado en un modelo de ALI *in vitro* que la disminución de la respuesta inflamatoria del sevoflurano es dosis-dependiente (81). Recientemente se demostró la capacidad del isoflurano para proteger del aumento de la permeabilidad capilar observado en un modelo de ALI en ratas (106). El preconditionamiento con sevoflurano parece disminuir el estrés oxidativo inducido por la ventilación unipulmonar en pacientes sometidos a lobectomía pulmonar (107), en consonancia con lo publicado por De Conno y colaboradores, que ya habían demostrado los efectos del sevoflurano sobre el reclutamiento de neutrófilos y la expresión de citoquinas proinflamatorias durante la ventilación unipulmonar (82).

No tenemos constancia de estudios previos que valoren la modulación de los efectos del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria y/o apoptótica en el LIRI a nivel histológico e inmunohistoquímico en un

modelo porcino, como el que se presenta en el presente estudio. Los resultados en este modelo tienen un especial interés por su proximidad al organismo humano y, por tanto, la posibilidad de extrapolar los resultados y conclusiones.

6.1 Efectos hemodinámicos del sevoflurano

En nuestro trabajo, todos los animales estudiados han demostrado una gran estabilidad hemodinámica a lo largo del procedimiento, observándose homogeneidad entre los distintos grupos. Estudios previos sugieren que el sevoflurano disminuye la tensión arterial, de modo dosis-dependiente, mediante la disminución de las resistencias vasculares periféricas, aunque no modifica el gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca, o el flujo sanguíneo coronario (61). La disminución de la presión arterial media basal observada en el grupo de animales preconditionado con sevoflurano podría estar relacionado con una disminución de las resistencias vasculares periféricas al administrar sevoflurano tras la inducción anestésica. Esta diferencia, encontrada solo en la determinación basal, no creemos que pueda tener implicaciones que interfirieran con los resultados. Tanto la medición prerreperusión como la posreperusión fueron similares en el resto de los grupos. Nuestros hallazgos son semejantes a los encontrados previamente por otros grupos de trabajo en modelos de ALI en animales con el uso de sevoflurano (108). Se observó un aumento de la presión capilar pulmonar en el

momento prerreperusión en los grupos sevoflurano y control, que podría estar relacionada con la ventilación unipulmonar. Tras la reperusión, en el grupo de animales preconditionado con sevoflurano, la presión capilar pulmonar fue menor que en el grupo control. La presión capilar pulmonar es uno de los factores determinantes en la formación del edema pulmonar (109), de modo que un aumento en sus valores fisiológicos podría implicar un aumento del estrés sobre las células del endotelio vascular pulmonar y, con ello, el desarrollo de lesión pulmonar aguda. Aunque sin significancia estadística, el edema observado en los tejidos de pulmón preconditionado es menor que en los animales del grupo control. Podría existir una relación entre estos dos hechos, interpretando la disminución del edema tisular como un posible efecto protector hemodinámico del gas halogenado. El efecto del sevoflurano sobre el edema tisular es bien conocido en modelos animales de ALI, demostrado en varios estudios mediante la disminución de la relación peso húmedo/seco (87,105,110), aunque su mecanismo de acción podría estar relacionado con la modulación de una proteína con funciones sobre la unión estrecha entre las células epiteliales alveolares pulmonares (106).

6.2 Efectos del sevoflurano sobre la oxigenación y el intercambio gaseoso

En nuestro trabajo, todos los animales estudiados han mostrado homogeneidad en cuanto a la oxigenación, los niveles de dióxido de carbono y el pH. Estos datos son positivos, ya que reafirman los resultados histológicos, que no serían atribuibles a efectos de cambios de oxigenación entre grupos. Sin embargo, otros autores en trabajos sobre modelos animales de IR obtuvieron resultados diferentes. El grupo de Casanova (87), en un modelo de LIRI porcino, describe una mejoría en los valores de oxigenación venosa en el grupo de cerdos precondicionados con sevoflurano tras la reperusión, que atribuyen a los efectos moduladores del sevoflurano sobre la respuesta inflamatoria pulmonar y, en consecuencia, de la función pulmonar.

En el trasplante pulmonar, como en nuestro modelo, la propia ventilación pulmonar mecánica constituye un ejemplo de ALI (111). La atelectasia, el tiempo de duración y la manipulación quirúrgica se relacionan con un aumento en los niveles de mediadores inflamatorios, como la IL-1 y el TNF α alveolares (112). La ventilación unipulmonar representa en si misma un modelo de lesión por IR pulmonar, originada fundamentalmente por el efecto de la vasoconstricción pulmonar hipóxica sobre el pulmón excluido. En el momento en que éste no se ventila, la hipoxia desencadena el reflejo fisiológico de vasoconstricción pulmonar hipóxica, que desvía el flujo sanguíneo a otras áreas mejor perfundidas,

disminuyendo el efecto *shunt* y mejorando la oxigenación sistémica (113), de modo que el pulmón no ventilado se queda prácticamente sin flujo sanguíneo. Una vez reexpandido el pulmón, con la ventilación y la desaparición de la hipoxia, se induce una vasodilatación equivalente a la reperfusión, tal como describe el grupo de Jordan (114), que tras 60 minutos de ventilación unipulmonar en un modelo animal porcino comprobó la presencia de congestión en los vasos pulmonares en el pulmón que se había mantenido hipóxico. Como ya hemos señalado, De Conno demostró los efectos protectores del sevoflurano frente al propofol durante la ventilación unipulmonar en un estudio en humanos (115). Mediante el análisis del lavado broncoalveolar, se demostró una disminución de la expresión de TNF α , IL-6, IL-8 y MCP-1 en el grupo tratado con sevoflurano, que relacionaron con una menor infiltración tisular de neutrófilos. Por otro lado, el grupo de Schilling (116) demostró en un primer trabajo que la anestesia general con desflurano actuaba sobre la producción alveolar de sustancias proinflamatorias en el pulmón dependiente durante la ventilación unipulmonar, disminuyendo la expresión de TNF α , IL-8, IL-10 e ICAM-1 en comparación con el uso de propofol. Posteriormente, publican otro trabajo en el que se compara el efecto de propofol con sevoflurano y desflurano, en pacientes humanos en los que se siguieron estrategias de ventilación protectora pulmonar (117), donde se confirmó la disminución de mediadores de la inflamación en los pulmones anestesiados con halogenados.

6.3 Efecto del sevoflurano sobre el reclutamiento de monocitos/macrófagos

Tras la observación al microscopio de las preparaciones de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina-eosina en los distintos animales, no nos sorprende encontrar una disminución en la infiltración tisular por MM en el grupo preconditionado con sevoflurano. Los MM forman parte del mecanismo iniciador del LIRI. En respuesta a la isquemia y al estrés oxidativo, inician la producción de citoquinas, como $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, que a su vez potencian la liberación de otras citoquinas como $\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-8, IL-10 o MCP-1, modulando la quimiotaxis y activación de otros MM, neutrófilos y linfocitos (6,20). En un modelo de IR en ratones se demostró su papel como centinela en fases precoces del daño pulmonar (118). La liberación de IL-1 en los primeros minutos posreperusión actuaba sobre las células endoteliales aumentando la producción de IL-6, poniendo en marcha la respuesta inflamatoria. La fase tan precoz de la reperusión estudiada en nuestro trabajo, podría justificar no encontrar diferencias histológicas importantes entre los grupos, si bien el aumento de infiltración tisular por MM es uno de los primeros signos anatomopatológicos en aparecer, de forma característica, en el LIRI (5,88). En nuestro trabajo, el sevoflurano muestra un efecto protector mediante la disminución de la infiltración de MM en el tejido pulmonar cuando lo comparamos con el grupo control, sin que existan diferencias con la infiltración de MM en el pulmón del grupo de cirugía simulada.

TINCION INMUNOHISTOQUÍMICA CON CD68

El CD-68 es uno de los marcadores de MM (MM) más usado en inmunohistoquímica, permitiéndonos valorar su presencia en los diferentes tejidos del organismo (119-122). Si bien su función a día de hoy sigue sin esclarecerse, parece relacionarse con la captación de lipoproteínas de baja densidad (123). La presencia de MM CD68 intracapilares mediante inmunohistoquímica se ha usado en un estudio en humanos con 33 receptores de trasplante pulmonar como marcador de predicción de rechazo mediado por anticuerpos (21). El CD68 se ha usado también para estudiar el papel de los MM en un modelo de ALI en ratón secundario a pancreatitis (22). Más recientemente se ha usado para mostrar la disminución del infiltrado de MM en un modelo de LIRI en ratas con hipertensión pulmonar tras la administración de una estatina (23), así como para demostrar mediante inmunofluorescencia el beneficio del uso de células madre mesenquimales en un modelo de LIRI en ratas (24).

En respuesta a la agresión tisular, el macrófago alveolar (MA) inicia la producción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, que a su vez potencia la liberación de otras citoquinas como el IFN γ , IL-6, IL-8, IL-10 o la MCP-1, modulando la quimiotaxis y activación de neutrófilos y linfocitos (6,20). Su papel en la fase aguda de la lesión IR está bien documentada en modelos animales en hígado (17), corazón (18) o riñón (124). En pulmón, el grupo de Kreisel ha demostrado la presencia de MA en un modelo animal de daño pulmonar de trasplante pulmonar (19). En nuestro trabajo, se observa la

expresión de células teñidas por CD68, que fundamentalmente corresponderían a MM, en consonancia con lo observado por Keisel. Este, en condiciones normales, observaba MM que se movían libremente por los vasos pulmonares, capilares alveolares y la red capilar subpleural. A las 2 horas del trasplante se pudo observar como los MM rodaban los vasos y empezaban a infiltrar los tejidos. Nuestro estudio está centrado en la fase más precoz de la reperfusión y nos permite observar lo sucedido en el pulmón a los 30 minutos de su inicio.

El grupo de Eppinger publicó dos trabajos en la década de los 90 del siglo pasado, donde estudiaban los mediadores inflamatorios del LIRI en un modelo de IR *in vivo* en ratas (6,14) y que sientan las bases del mecanismo de daño pulmonar en el LIRI. Tras someter al pulmón a 90 minutos de isquemia, estudiaban los efectos de la reperfusión durante 4 horas. Determinaron la existencia de daño pulmonar mediante los cambios de permeabilidad vascular pulmonar, observando que la naturaleza de la lesión era bifásica. Había dos picos de mayor actividad que tenían lugar a los 30 minutos y 1 hora posreperfusión. Mediante el uso de anticuerpos específicos, determinaron que el primer pico parecía ser dependiente de la expresión de mRNA de MCP-1 y $\text{TNF}\alpha$, mientras que el segundo solo dependía de la expresión de $\text{TNF}\alpha$. La respuesta precoz, a los 30 minutos, era neutrófilo-independiente, mientras que la respuesta tardía precisaba de estos para desarrollarse. Los MM residentes parecían ser los principales iniciadores de la cascada inflamatoria, produciendo ROS, $\text{TNF}\alpha$ y MCP-1, que inducían la lesión

pulmonar alterando la permeabilidad vascular. Las propias citoquinas producidas por los MM tenían un papel fundamental en el tropismo de neutrófilos, necesario para que estos últimos llegasen al pulmón donde, en una fase tardía, serían los principales responsables del daño pulmonar.

El aumento de MM CD68+ en los pulmones trasplantados de nuestro estudio apoyaría la teoría del comportamiento bifásico de los mediadores celulares en la IR, donde la respuesta inflamatoria precoz estaría mediada por los MM del donante, activados durante la fase de isquemia (15). La presencia de algunos MM CD68+ intersticiales con tan poco tiempo de evolución tras la reperfusión podría corresponder a MM del donante, que tendrían una función principal en la producción de los primeros mediadores inflamatorios, como IL1 y TNF α , como sugiere Laubach (125) y en consonancia con la teoría de Eppinger (6). La respuesta tan precoz tras la reperfusión se justificaría por la presencia de MM del donante, que inician la cascada inflamatoria con la liberación de citoquinas proinflamatorias. Esta fase sería por tanto neutrófilo-independiente. Una vez activada la cascada inflamatoria en células del receptor, la respuesta se haría neutrófilo-dependiente, a partir de las 4 horas, tomando éste el relevo como mediador principal (15,26). El equipo de Seekamp demostró, en un modelo animal en ratas, que la neutropenia inducida disminuye la lesión por IR, corroborando el papel de los neutrófilos tras el periodo precoz posreperfusión en el daño tisular (126).

Desconocemos la existencia de estudios en los que se muestre el comportamiento de los MM tras el fenómeno IR después de ser administrado un gas halogenado. Aunque si se ha observado con otros agentes farmacológicos. Matsuo y colaboradores (23) usaron el antígeno CD68 para demostrar el efecto de una estatina sobre la infiltración macrofágica en el LIRI, en un modelo in vivo en ratas. El preconditionamiento con rosuvastatina consiguió disminuir la infiltración macrofágica al final de la reperusión. Unos años antes, Steurer y colaboradores (127), en un modelo in vitro de daño a MA inducido por un polisacárido, demostraron como la exposición a sevoflurano conseguía disminuir la expresión de mediadores como TNF α y MCP-1 y la quimiotaxis de neutrófilos. El grupo de Casanova demostró en un modelo porcino las propiedades protectoras del preconditionamiento con sevoflurano mediante la disminución de la expresión de estos mediadores, si bien sus resultados se basaban en determinaciones bioquímicas sobre homogeneizado de tejido pulmonar (87). En nuestro trabajo, el grupo de animales tratado con sevoflurano consiguió disminuir la expresión de MM de forma significativa en el periodo posreperusión inmediato. La disminución de citoquinas inflamatorias observada por Casanova en su estudio podría estar mediada por el efecto del sevoflurano sobre la disminución de expresión de MM en las fases iniciales de la reperusión.

6.4 Efecto del sevoflurano sobre la expresión de MCP-1

TINCION INMUNOHISTOQUÍMICA DE MCP-1

En nuestro trabajo, encontramos un aumento de la expresión de MCP-1+ en el grupo de animales sometidos a IR con la tinción de células de estirpe neumocitaria y MM. El MCP-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1, es una proteína del grupo de las quimioquinas secretada de forma constitutiva o en respuesta al estrés oxidativo, la liberación de otras citoquinas proinflamatorias o factores de crecimiento durante la inflamación (128). Aunque es producida por una gran variedad de tipos celulares, su fuente principal de producción parecen ser los MM (129), (32). Entre sus funciones, destaca su papel en el reclutamiento e infiltración de MM, LT y NK (35). Su implicación en la cascada inflamatoria ha sido ampliamente estudiada (130-132), demostrando su protagonismo en múltiples procesos inflamatorios pulmonares como asma, fibrosis pulmonar o bronquiolitis obliterante (38,133-135).

En el ámbito de la IR, se ha observado la importancia del MCP-1 en la primera fase de la respuesta inflamatoria posreperfusión en varios modelos en distintos órganos (136-138). Como ya se ha referido, hemos encontrado un aumento de la expresión de MCP-1+ en el grupo de animales sometidos a IR con la tinción de células de estirpe neumocitaria y MM en nuestro trabajo. El grupo de Sekine estudió el papel del MCP-1

durante el rechazo agudo de aloinjerto de pulmón en un modelo animal en rata y su papel como factor quimiotáctico para linfocitos infiltrantes de injerto (139). Mediante técnicas inmunohistoquímicas demostró el aumento de MCP-1 tras una semana del trasplante pulmonar, sin que tengamos constancia de trabajos que demuestren su implicación a nivel inmunohistoquímico en fases precoces.

Nuestros resultados son consistentes con lo demostrado previamente por el grupo de Sharma (32) en un modelo *in vitro* de IR pulmonar, donde aumentaba la expresión de MCP-1 en MA y neumocitos tipo II una hora posreperfusión. También el grupo de Zhao (140), en un modelo de LIRI en un pulmón aislado de ratón, observó un aumento de MCP-1 una hora tras la reperfusión, modulando su expresión la administración de un inhibidor de la función macrofágica, lo que confirma el papel fundamental del macrófago en la expresión de MCP-1. En consonancia con Sekine, que demostró que la fuente principal de producción de MCP-1 eran los MM (139). Sin embargo, algunos resultados son contradictorios. El grupo de Krishnadasan (141), con un estudio en un modelo de IR en ratas, restó importancia al papel del MCP-1 en el LIRI tras no conseguir determinarlo en homogeneizado de tejido pulmonar hasta 4 horas después de la reperfusión, poniendo en duda su papel promotor de la respuesta inflamatoria por IR. Estos hallazgos contradicen los resultados del ya clásico trabajo de Eppinger en 1997 (6) en el que se demostraba la expresión de MCP-1 tras la reperfusión, con un pico máximo a los 30 minutos, coincidiendo con los tiempos de nuestro

estudio, e introduciendo la teoría del comportamiento bifásico de los mediadores de la inflamación en el LIRI. Simón y colaboradores (142), de acuerdo a lo observado por nosotros en el grupo de cerdos no preconditionado, demostraron un aumento progresivo de la expresión de MCP-1 en homogeneizado de tejido pulmonar porcino, desde el inicio de la isquemia hasta los 30 minutos posreperusión.

Hemos conseguido demostrar que el sevoflurano en el grupo de animales preconditionado disminuye la expresión de células MCP-1+ en la fase precoz tras el LIRI. Tampoco tenemos constancia de trabajos que evalúen el efecto modulador de un gas halogenado sobre la expresión de MCP-1 en el LIRI mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, diferentes estudios de determinación de MCP-1 en modelos de ALI o LIRI han encontrado disminuciones de su expresión en concentraciones séricas, lavado broncoalveolar o homogeneizado de tejido pulmonar, de acuerdo con nuestros hallazgos. Los grupos de De Conno (82) y Urner (143) *in vivo* y Suter (81) *in vitro*, comprobaron la disminución desde la primera hora posreperusión de los niveles de MCP-1 en modelos de ALI tras el preconditionamiento con sevoflurano. También en los trabajos en que la exposición al halogenado fue a continuación de la agresión, es decir, cuando se realizó poscondicionamiento, se registraron disminuciones de la expresión de MCP-1 (127,144-145).

Hemos demostrado la disminución del reclutamiento de MM en el grupo de animales preconditionados con sevoflurano. Se sabe que la

cascada inflamatoria en el periodo posreperfusión inicia, en parte, de la actividad de los MM incluidos en el tejido del donante (125). El efecto protector del sevoflurano sobre la expresión de MCP-1 podría estar justificado por la disminución de la quimiotaxis de MM del donante (activadores de la cascada inflamatoria) sobre los MM del propio receptor. Éstos expresarían una menor cantidad citoquinas proinflamatorias, explicando a su vez la menor expresión de MCP-1 por parte de las células epiteliales pulmonares y de los propios MM.

6.5 Efecto del sevoflurano sobre la expresión de caspasa 9 y Bcl-2

TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA 9 Y Bcl-2

La apoptosis es un proceso de suicidio celular, conservado a lo largo de la evolución, que es ejecutado a través de proteasas de cisteína, las caspasas, y regulado por un grupo de proteínas pro y antiapoptóticas, las proteínas de la familia Bcl-2 (52). Los complejos mecanismos de la apoptosis han sido motivo de estudio en diferentes modelos animales y humanos de IR en corazón, hígado, sistema nervioso y riñón (146-147), (148-149), aunque en el pulmón son pocos los trabajos que nos ayuden a comprenderlos.

En estudios experimentales de trasplante pulmonar en roedores se ha observado que un periodo corto de isquemia (20 minutos) no está asociado a incremento en la muerte por necrosis o apoptosis (49). Si el periodo de isquemia, sin reperfusión, se prolongaba varias horas (hasta 18 horas), se podía observar una importante cantidad de tejido de necrosis celular, aunque no fenómenos de apoptosis (44). Cuando los estudios se realizaron durante los periodos de isquemia y reperfusión, en periodos de isquemia fría del pulmón a trasplantar inferiores a 12 horas, predomina la muerte por apoptosis (2% necrosis vs. 30% apoptosis), mientras que periodos de conservación mayores de 12 horas se asocian a un aumento de la muerte por necrosis (21-29% necrosis vs. <1% apoptosis) en un modelo de trasplante en ratas (49). A diferencia de la necrosis, la apoptosis no está presente durante la fase de isquemia, apareciendo en el daño IR sólo tras la reperfusión. En el ámbito del trasplante pulmonar en humanos, los fenómenos apoptóticos prácticamente no se identifican en periodos de isquemia fría o caliente de hasta 5 horas (49). Los fenómenos apoptóticos solo se evidenciaron tras la reperfusión, aumentando en el tiempo hasta un pico de 2 horas posreperfusión (44).

Del grupo de las caspasas, destaca por su papel la caspasa 9. Clasificada por su función dentro del grupo de las caspasas iniciadoras, su papel en la vía intrínseca es fundamental al unirse al APAF-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas-1) y al citocromo c para la

formación del apoptosoma (150). Éste a su vez se ocupará de activar la caspasa 3 y, junto a la 6 y la 7, fragmentar el DNA celular, completando el proceso de apoptosis (54). En nuestro trabajo hemos observado un aumento de la expresión de células neumocitarias con tinción caspasa 9 + a los 30 minutos posreperfusión en el grupo de animales no preconditionados. Estos resultados son consistentes con lo publicado en los modelos de LIRI *in vivo* e *in vitro* por Zhang (57), que observó en ambos un aumento de los niveles de caspasa 9 y disminución de los niveles de Bcl-2 tras la reperfusión. Lo mismo se observó en los modelos animales de los grupos de Zraggen (151) y Fujinaga (152). El grupo de Quadri (50), además del aumento tras la reperfusión en un modelo de LIRI en ratas, observó disminución del fenómeno apoptótico tras la administración de un inhibidor específico de caspasas, confirmando el papel de la caspasa 9 en la apoptosis.

La proteína Bcl-2 es la fundadora de la familia que recibe el mismo nombre, encargada de regular procesos de permeabilización mitocondrial. Estas proteínas están divididas en dos grupos según su función: proapoptóticas (como Bax, Bak, Bid, Bad...) y antiapoptóticas (como la propia Bcl-2, Bcl-X_L, A1 y Mcl-1). La función de la Bcl-2 parece estar relacionada con la estabilización de la membrana mitocondrial, evitando la salida de citocromo c y con ella la formación del apoptosoma, e inhibiendo la apoptosis al impedir la activación de la caspasa 3 (54). En nuestro trabajo hemos observado una disminución de la expresión de células neumocitarias con tinción Bcl-2 + tras la reperfusión en el grupo de

animales no preconditionado, en consonancia con lo observado por los grupos de Shi (55), Cao (56) o Zhang (57).

El aumento de la caspasa 9 y disminución del Bcl-2 que hemos encontrado en nuestro estudio en el grupo de cerdos no preconditionados podría indicar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Confirma lo observado por el grupo de Wolfs, aunque en otro órgano como es el riñón (146), donde tras el explante renal la activación de la vía intrínseca se traduce en un aumento progresivo de la caspasa 9 y, al mismo tiempo, una disminución progresiva de la expresión de Bcl-2. En nuestro estudio este fenómeno tiene lugar de forma precoz tras la reperusión. Esto coincide con los hallazgos del grupo de Fischer en trasplante pulmonar humano (49), donde se describe el aumento de muerte celular por apoptosis que inicia en el periodo de isquemia fría y continua hasta 2 horas tras la reperusión. El grupo de Stammberger (44), en trasplante pulmonar en ratas, observó también un aumento de la muerte por apoptosis, describiendo un pico máximo de actividad a las 2 horas posreperusión.

En nuestro trabajo, además, observamos una disminución de la expresión de células neumocitarias caspasa 9 + cuando se preconditiona al grupo de cerdos con sevoflurano, que se acompaña de un aumento de la expresión de células neumocitarias Bcl-2 +, indicando un posible efecto protector del sevoflurano sobre la apoptosis celular.

Los pocos estudios realizados con gases halogenados sobre IR en los últimos años revelan resultados contradictorios. El equipo de Zhang publicó en 2010 (153) un trabajo en células neurales aisladas y ratones en el que se describe el aumento de la apoptosis en el grupo expuesto a isoflurano. Se observó que tras la disminución de la expresión de Bcl-2, aumentó la formación de ROS y liberación de citocromo c al citosol, que resultaron en un aumento de la expresión de caspasa 9 y con ella de apoptosis, potenciándose los efectos de la IR sobre la vía intrínseca. En el mismo sentido, el equipo de Qiu (147) observó un aumento de la apoptosis y disminución de la expresión de Bcl-2 tras la exposición a sevoflurano de células madre neurales aisladas y, en pulmón, Wei (154) describió un aumento en la apoptosis en células epiteliales pulmonares aisladas tras la exposición a sevoflurano.

Sin embargo, recientemente se han publicado resultados opuestos en diferentes órganos. Se ha observado una disminución de la apoptosis en modelos animales tras IR en corazón (155), cerebro (105) e intestino (76), donde también se registraba un aumento de la expresión de la proteína Bcl2. En consonancia con lo observado en nuestro trabajo, el equipo de Li (156) ha comprobado, en un modelo de ALI en ratones y mediante tinción inmunohistoquímica, el aumento de la expresión de Bcl-2 tras la exposición a isoflurano, consiguiendo inhibir la aparición de apoptosis celular. En un trabajo reciente en trasplante pulmonar humano, Cooke y colaboradores (58) describen como, al inducir genéticamente una

sobreexpresión de Bcl-2 antes de realizarse el trasplante pulmonar, disminuyen los niveles en citosol de citocromo c y las actividades de las caspasa 3 y 9, mejorando la función del injerto pulmonar. Más recientemente, el grupo de Ohsumi (110) ha confirmado esos hallazgos, al describir el efecto antiapoptótico del sevoflurano en un modelo de LIRI en trasplante pulmonar en ratas mediante la disminución, tanto de la liberación de citocromo c al citosol, como de la escisión de la caspasa 3. El aumento de expresión de Bcl-2 en las células de los animales expuestos a sevoflurano de nuestro trabajo podría tener un efecto protector frente a la apoptosis. La disminución en su expresión por el gas halogenado podría disminuir la liberación de citocromo c al citosol y, con ello, inducir una menor conversión de procaspasa 9 a caspasa 9, disminuyendo esta última su expresión. Esto implicaría una menor activación de la cascada intrínseca de la apoptosis y, con ella, de la muerte celular por apoptosis.

Con este trabajo hemos demostrado los efectos antiinflamatorios del gas halogenado sevoflurano, mediante la disminución del reclutamiento de MM y expresión de MCP-1, y sus efectos antiapoptóticos, mediante la disminución de la expresión de caspasa 9 y el aumento en la expresión de Bcl-2, en un modelo porcino de LIRI en autotrasplante pulmonar. Se trata del primer trabajo sobre los efectos moduladores del sevoflurano a nivel histopatológico en la fase precoz de la reperfusión. En consonancia con lo demostrado por otros autores

previamente, afianza el uso del sevoflurano por sus propiedades protectoras y avanza hacia un nuevo campo de posibilidades terapéuticas.

En nuestro trabajo reconocemos la existencia de algunas limitaciones. El poco tiempo de observación posreperfusión no nos permite observar la evolución del comportamiento de MM o su relación con la expresión de MCP-1, así como determinar el papel de la caspasa 9 y Bcl-2 en el desarrollo de la apoptosis en fases tardías, bajo los efectos del sevoflurano. La posibilidad de marcar los MM del pulmón explantado, iniciadores de la actividad inflamatoria, nos permitiría conocer hasta que punto su función es importante en la activación de la cascada de eventos, así como en el reclutamiento de MM del receptor, y los cambios tras la administración del gas halogenado. El estudio de un mayor número de mediadores de la inflamación y apoptosis nos permitiría tener una mejor visión general de los acontecimientos y de las vías de señalización, para determinar aspectos como el papel del sevoflurano sobre la función de los neutrófilos en la continuación de la lesión IR, o la determinación del número de células apoptóticas para valorar de forma cuantitativa el efecto del gas sobre la muerte celular por apoptosis. La determinación de un mayor número de mediadores principales de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, así como de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, nos permitirían conocer bien los efectos del sevoflurano sobre cada una de ellas. Otra limitación radica en el reducido número de

la muestra. Tanto la complejidad del experimento como el intento de minimizar el número de animales sacrificados, justifican el uso de un número pequeño de animales, pero suficiente para la obtención de resultados científicamente válidos. Todas estas limitaciones no hacen sino animarnos al diseño y realización de nuevos trabajos que permitan profundizar en el conocimiento de los mecanismos protectores del sevoflurano y, con ello, optimizar su aplicabilidad terapéutica en nuestra práctica clínica habitual.

Con el avance de la Medicina y la tecnología, cada vez se realizan más procedimientos quirúrgicos en los que es preciso instaurar en el tejido pulmonar un periodo de isquemia. El LIRI constituye hoy en día un problema importante, que en algunos casos determina la posterior viabilidad del órgano intervenido. Con este trabajo hemos estudiado por primera vez la fase precoz del LIRI en tejido pulmonar en un modelo de IR porcino de autotrasplante pulmonar mediante técnicas de tinción histológicas e inmunohistoquímicas. Hemos comprobado un aumento de los fenómenos inflamatorios mediante el aumento de la infiltración de MM, de la expresión de CD68, y de la expresión del mediador proinflamatorio MCP-1. También de los fenómenos apoptóticos, mediante el aumento de expresión de una de las ejecutoras de la apoptosis, la caspasa 9, y la disminución de la expresión de una proteína antiapoptótica, la Bcl-2. Hemos demostrado como el preconditionamiento con el gas halogenado sevoflurano produce un efecto protector sobre el tejido pulmonar, modulando la respuesta inflamatoria mediante la disminución de la

infiltración de MM, la expresión de MCP-1, y la respuesta apoptótica, mediante una menor expresión de la caspasa 9 y un aumento de la expresión de Bcl-2. Se necesitan más estudios que avancen en el conocimiento en profundidad de los mecanismos por los que los gases halogenados, como el sevoflurano, tienen un efecto protector sobre el pulmón, que nos permitan optimizar la preparación del paciente que va a ser sometido a un procedimiento quirúrgico, minimizando las complicaciones, con las repercusiones de tipo humano y económico que esto implica.

7 CONCLUSIONES

1. En el presente modelo de autotrasplante pulmonar, la isquemia-reperfusión induce infiltración del tejido pulmonar por monocitos/macrófagos, según se observa mediante microscopía y tinción convencional, y ésta infiltración fue menos pronunciada cuando se realizó preconditionamiento anestésico con sevoflurano.
2. El estudio inmunohistoquímico de la expresión de CD68 demuestra que a los treinta minutos de la reperfusión pulmonar ya se observa un aumento significativo de infiltración del tejido pulmonar por monocitos/macrófagos, y que el preconditionamiento con sevoflurano disminuye esta respuesta.
3. Este aumento, en tejido pulmonar, de la infiltración por monocitos/macrófagos en las fases precoces de la reperfusión, se asocia a una mayor expresión inmunohistoquímica de la proteína quimiotáctica de monocitos - 1, mientras que la menor infiltración por macrófagos que se observa en los pulmones preconditionados con sevoflurano se asocia a menor expresión de MCP-1.
4. En este modelo experimental, el preconditionamiento con sevoflurano parece proteger al pulmón de la respuesta proapoptótica inducida por isquemia-reperfusión, ya que, tras la reperfusión se observó un aumento de expresión inmunohistoquímica de caspasa 9, principalmente en células neumocitarias, mientras que en los pulmones

precondicionados no se observó este aumento de caspasa 9 y sí una mayor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

5. Este trabajo muestra que el preconditionamiento anestésico con sevoflurano protege frente a la respuesta inflamatoria y apoptótica en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar en autotrasplante pulmonar porcino, disminuyendo la inflamación mediante la modulación de la infiltración monocítica/macrofágica, la expresión de CD68 y MCP-1, y la respuesta apoptótica, disminuyendo la expresión de caspasa 9 y aumentando la expresión de Bcl-2.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Collard C, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. 2001 Jan 21;(94):1133–8.
2. Di Napoli P, Taccardi AA, De Caterina R, Barsotti A. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: experimental data. *Ital Heart J*. 2002 Jun;3 Suppl 4:24S–28S.
3. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. 2006 Apr;38(3):826–8.
4. de Perrot M. Ischemia-Reperfusion-induced Lung Injury. 2003 Feb 15;167(4):490–511.
5. Hengst den WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Oct 29;299(5):H1283–99.
6. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*. 1997 May;150(5):1773–84.
7. Vural KM, Oz MC. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000 Sep;18(3):348–52.
8. Kim JD, Baker CJ, Danto SI, Starnes VA. Modulation of pulmonary Na⁺ pump gene expression during cold storage and reperfusion. *Transplantation*. 2000;80(7):1016–20.
9. Khimenko PL, Moore TM, Hill LW, Wilson PS, Coleman S, Rizzo A, et al. Adenosine A2 receptors reverse ischemia-reperfusion lung injury independent of beta-receptors. *J Appl Physiol*. 1995 Mar;78(3):990–6.
10. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. 1986 Jan;90(1):80–4.
11. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. 1987 Nov;1(5):358–64.
12. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. 2000 Dec;136(6):427–40.
13. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(4):L575–82.

14. Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. 1995 Jun;58(6):713–8.
15. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Elsevier; 2001 Jun;121(6):1069–75.
16. Kambara K, Ohashi W, Tomita K, Takashina M, Fujisaka S, Hayashi R, et al. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. *The American Journal of Pathology*. Elsevier; 2015 Jan;185(1):162–71.
17. Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, et al. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1994 Oct;267(4 Pt 1):G630–6.
18. Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest*. 2000 Jul;80(7):1127–36.
19. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, et al. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Oct 19;107(42):18073–8.
20. Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga CH, Goss CH, et al. Early tumor necrosis factor- α release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2004 May;127(5):1502–8.
21. Westall GP, Snell GI, McLean C, Kotsimbos T, Williams T, Magro C. C3d and C4d deposition early after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. Elsevier; 2008 Jul;27(7):722–8.
22. Akbarshahi H, Menzel M, Posaric Bauden M, Rosendahl A, Andersson R. Enrichment of murine CD68+ CCR2+ and CD68+ CD206+ lung macrophages in acute pancreatitis-associated acute lung injury. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e42654.
23. Matsuo S, Saiki Y, Adachi O, Kawamoto S, Fukushima S, Horii A, et al. Single-dose rosuvastatin ameliorates lung ischemia-reperfusion injury via upregulation of endothelial nitric oxide synthase and inhibition of macrophage infiltration in rats with pulmonary hypertension. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2015 Mar;149(3):902–9.
24. Sun C-K, Leu S, Hsu S-Y, Zhen Y-Y, Chang L-T, Tsai C-Y, et al.

- Mixed serum-deprived and normal adipose-derived mesenchymal stem cells against acute lung ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transl Res*. 2015;7(2):209–31.
25. Bless NM, Huber-Lang M, Guo RF. Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 β , monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *The Journal of Immunology*. 2000;164(5):2650–9.
 26. Deeb GM, Grum CM, Lynch MJ, Guynn TP, Gallagher KP, Ljungman AG, et al. Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol*. 1990 Jan;68(1):374–81.
 27. Pedreira PR, Garcia-Prieto E, Albaiceta GM. Respuesta inflamatoria y apoptosis en la lesión pulmonar aguda. *Med Intensiva*. 2006;30(6):268–75.
 28. Chang DM, Hsu K, Ding YA, Chiang CH. Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997 Oct;156(4 Pt 1):1230–4.
 29. Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol*. 1998 Dec;85(6):2005–11.
 30. Terlikowski SJ. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. 2001;46:5–18.
 31. Chang D-M, Hsu K, Ding Y-A. Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. 1997 Jan 21;156(1):1230–4.
 32. Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kron IL, Laubach VE. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF-alpha during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. American Physiological Society; 2007 Jul;293(1):L105–13.
 33. Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2007 Jun 15;109(12):2392–404.
 34. Hyduk SJ, Chan JR, Duffy ST, Chen M, Peterson MD, Waddell TK, et al. Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood*. American Society of Hematology; 2007 Jan 1;109(1):176–84.
 35. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313–26.

36. Altemeier WA, Liles WC, Villagra-Garcia A, Matute-Bello G, Glenn RW. Ischemia-reperfusion lung injury is attenuated in MyD88-deficient mice. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77123.
37. González-Casaurrán G, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, Garutti I, et al. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión. 2011 Jun;47(6):283–9.
38. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Sep 30;178(3):439–48.
39. Hoffman SA, Wang L, Shah CV, Ahya VN, Pochettino A, Olthoff K, et al. Plasma cytokines and chemokines in primary graft dysfunction post-lung transplantation. *Am J Transplant*. 2009 Feb;9(2):389–96.
40. Shah RJ, Diamond JM, Lederer DJ, Arcasoy SM, Cantu EM, Demissie EJ, et al. Plasma monocyte chemotactic protein-1 levels at 24 hours are a biomarker of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Transl Res*. 2012 Dec;160(6):435–42.
41. Pearse DB, Wagner EM. Role of the bronchial circulation in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol*. 1994 Jan;76(1):259–65.
42. Bishop MJ, Giclas PC, Guidotti SM, Su ML, Chi EY. Complement activation is a secondary rather than a causative factor in rabbit pulmonary artery ischemia/reperfusion injury. *Am Rev Respir Dis*. American Lung Association; 1991 Feb;143(2):386–90.
43. Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 May;19(5):429–38.
44. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2000 May;69(5):1532–6.
45. Naval J, Marzo I, Anel A. Mecanismos celulares de muerte celular programada. *Haematol*. 2004 Oct 1;89(Supl E1):126–48.
46. Ng CSH, Wan S, Yim APC. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *Eur Respir J*. 2005 Feb;25(2):356–63.
47. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000 Nov;162(5):1932–9.

48. Fischer S, De Perrot M, Liu M, MacLean AA, Cardella JA, Imai Y, et al. Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Elsevier; 2003 Oct;126(4):1174–80.
49. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. 2000 Mar;231(3):424–31.
50. Quadri SM, Segall L, De Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):292–9.
51. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L632–41.
52. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1–16.
53. Buccellato LJ, Tso M, Akinci OI, Chandel NS, Budinger GRS. Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6753–60.
54. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 6 ed. 2007 Jun;35(4):495–516.
55. Shi L, Jia X-G, Luo M, Liu Y-K, Zhao S, Chen H-E, et al. [Effects of ischemic postconditioning on pneumocyte apoptosis after lung ischemia/reperfusion injury in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2014 Jan;30(1):60–3.
56. Cao Q-F, Qu M-J, Yang W-Q, Wang D-P, Zhang M-H, Di S-B. Ischemia postconditioning preventing lung ischemia-reperfusion injury. *Gene*. 2015 Jan 1;554(1):120–4.
57. Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2003 Jun 13;278(24):22061–70.
58. Cooke DT, Hoyt EG, Robbins RC. Overexpression of Human Bcl-2 in Syngeneic Rat Donor Lungs Preserves Posttransplant Function and Reduces Intra-graft Caspase Activity and Interleukin-1?? Production. *Transplantation*. 2005 Apr;79(7):762–7.
59. Weyker PD, Webb CAJ, Kiamanesh D, Flynn BC. Lung ischemia

reperfusion injury: a bench-to-bedside review. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013 Mar;17(1):28–43.

60. Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA. Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. *Pharmacotherapy*. 2005 Dec;25(12):1773–88.
61. De Hert S, Moerman A. Sevoflurane. *F1000Res*. 2015;4(F1000 Faculty Rev):626.
62. Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. 1981 Feb;13(2):229–39.
63. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. 1986 Nov;74(5):1124–36.
64. Luh S-P, Yang P-C. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. 2006 May;7(5):331–41.
65. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. 1997 Nov;87(5):1182–90.
66. Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology*. 2004 Mar;100(3):707–21.
67. Han J, Kim E, Ho WK, Earm YE. Effects of volatile anesthetic isoflurane on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit ventricular myocytes. 1996 Dec 24;229(3):852–6.
68. Daut J, Maier-Rudolph W, Beckerath von N, Mehrke G, Günther K, Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science*. 1990 Mar 16;247(4948):1341–4.
69. Kehl F, Krolikowski JG, Tessmer JP, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Increases in coronary collateral blood flow produced by sevoflurane are mediated by calcium-activated potassium (BKCa) channels in vivo. 2002 Sep;97(3):725–31.
70. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. 1997 Aug;87(2):361–70.
71. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Morphine enhances pharmacological preconditioning by

isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. 2003 Mar;98(3):705–11.

72. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Garcia C, Schaub MC. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. 2002 Jul;97(1):15–23.
73. Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE. Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K(ATP) channels. 2002 Jul;283(1):H61–8.
74. Xu Z, Yu J, Wu J, Qi F, Wang H, Wang Z, et al. The Effects of Two Anesthetics, Propofol and Sevoflurane, on Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(4):1631–42.
75. Fukazawa K, Lee HT. Volatile anesthetics and AKI: risks, mechanisms, and a potential therapeutic window. *J Am Soc Nephrol*. 2014 May;25(5):884–92.
76. Liu C, Liu Y, Shen Z, Miao L, Zhang K, Wang F, et al. Sevoflurane Preconditioning Reduces Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury: Role of Protein Kinase C and Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0141426.
77. Matchett GA, Allard MW, Martin RD, Zhang JH. Neuroprotective effect of volatile anesthetic agents: molecular mechanisms. 2009 Mar;31(2):128–34.
78. Reutershan J, Chang D, Hayes JK, Ley K. Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology*. 2006 Mar;104(3):511–7.
79. Giraud O, Seince PF, Rolland C, Leçon-Malas V, Desmonts JM, Aubier M, et al. Halothane reduces the early lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mechanically ventilated rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000 Dec;162(6):2278–86.
80. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. 2000 Mar;92(3):833–40.
81. Suter D, Spahn DR, Blumenthal S, Reyes L, Booy C, Z'graggen BR, et al. The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells. *Anesth Analg*. 2007 Mar;104(3):638–45.
82. De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M, Zalunardo MP, Weder W, Schneider D, et al. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. 2009

Jun;110(6):1316–26.

83. Liu R, Ishibe Y, Ueda M, Hang Y. Isoflurane administration before ischemia and during reperfusion attenuates ischemia/reperfusion-induced injury of isolated rabbit lungs. 1999 Sep;89(3):561–5.
84. Barth J, Petermann W, Entzian P, Wustrow C, Wustrow J, Ohnhaus EE. Modulation of oxygen-free radicals from human leukocytes during halothane- and enflurane-induced general anesthesia. 1987 Nov;31(8):740–3.
85. Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, et al. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. 1997 Jan;86(1):188–95.
86. Tait AR, Davidson BA, Johnson KJ, Remick DG, Knight PR. Halothane inhibits the intraalveolar recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in response to influenza virus infection in mice. 1993 May;76(5):1106–13.
87. Casanova J, Simón Adiego C, Giraldez A, Martin B, Gonzalez G, Azcarate L, et al. The effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung autotransplant model in pigs. 2011 Oct;113(4):742–8.
88. Rodríguez NS, Barrasa J, González M. Valoración de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo precoz en el trasplante pulmonar experimental con tiempo de isquemia prolongado. Arch Bronconeumol. 2007;43(7):373–7.
89. Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. 1993 Mar;105(3):480–91.
90. Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. 1992 Apr;72(4):1454–60.
91. Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, Ayene I, Eckenhoff RG. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. J Clin Invest. 1991 Aug;88(2):674–9.
92. Allison RC, Kyle J, Adkins WK, Prasad VR, McCord JM, Taylor AE. Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. 1990 Aug;69(2):597–603.
93. Geft IL, Fishbein MC, Ninomiya K, Hashida J, Chaux E, Yano J, et al. Intermittent brief periods of ischemia have a cumulative effect and may cause myocardial necrosis. 1982 Dec;66(6):1150–3.
94. Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, Koneru B. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to

bedside translation. 2008 Nov;14(11):1569–77.

95. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Martens S, Zahn PK, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015 Jun 2;313(21):2133–41.
96. Selim M, Wang M. Ischemic Preconditioning: The Long-Awaited Savior of Neuroprotection. Has It Arrived? *Neurotherapeutics*. Springer US; 2015 Jul;12(3):655–6.
97. Erling Junior N, Montero EF de S, Sannomiya P, Poli-de-Figueiredo LF. Local and remote ischemic preconditioning protect against intestinal ischemic/reperfusion injury after supraceliac aortic clamping. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Dec;68(12):1548–54.
98. Hussein AM, Harraz AM, Awadalla A, Barakat N, Khater S, Shokeir AA. Remote limb ischemic preconditioning (rIPC) activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in renal ischemia/reperfusion injury. *Gen Physiol Biophys*. 2016 Jan;35(1):77–86.
99. Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. 1988 Oct;69(4):552–65.
100. Fudickar A, Kunath S, Voß D, Siggelkow M, Cavus E, Steinfath M, et al. Effect of ischemic and pharmacological preconditioning of lower limb muscle tissue on tissue oxygenation measured by near-infrared spectroscopy--a pilot study. *BMC Anesthesiol. BioMed Central*; 2014;14(1):54.
101. Zhang Y, Tian S-Y, Li Y-W, Zhang L, Yu J-B, Li J, et al. Sevoflurane preconditioning improving cerebral focal ischemia-reperfusion damage in a rat model via PI3K/Akt signaling pathway. *Gene*. 2015 Sep 10;569(1):60–5.
102. Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yatsu Y, Muraoka M, Matsuki A. Exposure to cigarette smoke impairs alveolar macrophage functions during halothane and isoflurane anesthesia in rats. 1999 Dec;91(6):1823–33.
103. Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yasuda T, Ebina T, Muraoka M, et al. Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. 1999 Nov;89(5):1250–6.
104. Takala RSK, Soukka HR, Salo MS, Kirvelä OA, Kääpä PO, Rajamäki AA, et al. Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs. 2004 Jan;48(1):40–5.

105. Kim S-H, Li M, Pyeon T-H, So K-Y, Kwak S-H. The volatile anesthetic sevoflurane attenuates ventilator-induced lung injury through inhibition of ERK1/2 and Akt signal transduction. *Korean J Anesthesiol.* 2015 Feb;68(1):62–9.
106. Englert JA, Macias AA, Amador-Munoz D, Pinilla Vera M, Isabelle C, Guan J, et al. Isoflurane Ameliorates Acute Lung Injury by Preserving Epithelial Tight Junction Integrity. *Anesthesiology.* 2015 Aug;123(2):377–88.
107. Feng H, Wang GM, Qiao Y, Zhao X, Liu DY. Effects of sevoflurane preconditioning on lung injury during one lung ventilation. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(8): 13634–13638.
108. Romero A, Moreno A, Sánchez C, Santos M, García J. Effects of sevoflurane on ventilator induced lung injury in a healthy lung experimental model. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación.* 2016 Jan;63(1):22–8.
109. Saenz-Valiente A, Piacentini E, García AV. Papel de la microcirculación en el desarrollo de la lesión pulmonar aguda inducida por la ventilación mecánica. *Medicina intensiva.* 2005;29(4):226–35.
110. Ohsumi A, Marseu K, Slinger P, McRae K, Kim H. Sevoflurane Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Lung Transplantation Model. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2017;0(0):0.
111. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. 1998 Jan;157(1):294–323.
112. Tekinbas C, Ulusoy H, Yulug E, Erol MM, Alver A, Yenilmez E, et al. One-lung ventilation: for how long? 2007 Aug;134(2):405–10.
113. Lumb AB, Slinger P. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications. *Anesthesiology.* 2015 Apr;122(4):932–46.
114. Jordan S. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. 2000 May 12;15:790–9.
115. De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M, Zalunardo MP, Weder W, Schneider D, et al. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology.* 2009 Jun;110(6):1316–26.
116. Schilling T, Kozian A, Kretzschmar M, Huth C, Welte T, Buhling F, et al. Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation. 2007 Jun 7;99(3):368–75.

117. Schilling T, Kozian A, Senturk M, Huth C, Reinhold A, Hedenstierna G, et al. Effects of volatile and intravenous anesthesia on the alveolar and systemic inflammatory response in thoracic surgical patients. 2011 Jul;115(1):65–74.
118. Prakash A, Mesa KR, Wilhelmsen K, Xu F, Dodd-o JM, Hellman J. Alveolar macrophages and Toll-like receptor 4 mediate ventilated lung ischemia reperfusion injury in mice. *Anesthesiology*. 2012 Oct;117(4):822–35.
119. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):901–44.
120. Ampawong S, Chaisri U, Viriyavejakul P, Prapansilp P, Grau GE, Turner GDH, et al. A potential role for interleukin-33 and γ -epithelium sodium channel in the pathogenesis of human malaria associated lung injury. *Malar J*. 2015 Oct 5;14:389.
121. Dang S-C, Jiang D-L, Chen M, Li D, Zhang J-X. Clodronate-containing liposomes attenuate lung injury in rats with severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010 Nov;11(11):828–35.
122. Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF, Holian A, Hoyle GW, Banks W, et al. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res*. 1998 Nov;24(6):721–43.
123. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Oct 10;92(21):9580–4.
124. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int*. Elsevier; 1999 Jun;55(6):2362–7.
125. Laubach VE, Kron IL. Pulmonary inflammation after lung transplantation. *Surgery*. 2009 Jul;146(1):1–4.
126. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA. Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. 1993 Apr;142(4):1217–26.
127. Steurer M, Schlöpfer M, Z'graggen BR, Booy C, Reyes L, Spahn DR, et al. The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Feb;155(2):224–30.

128. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 1991 May 25;266(15):9912–8.
129. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *The Journal of Immunology. American Association of Immunologists*; 1989 Mar 15;142(6):1956–62.
130. Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, Bethea S, Cox M, Hanley EN. Proinflammatory cytokines modulate the chemokine CCL2 (MCP-1) in human annulus cells in vitro: CCL2 expression and production. *Exp Mol Pathol*. 2015 Feb;98(1):102–5.
131. Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RHJ, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJA. Expression of MCP-1 by Reactive Astrocytes in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. *Am J Pathol. Elsevier*; 1999 Jan 1;154(1):45–51.
132. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology*. 1995 Jan;108(1):40–50.
133. Rose CE, Sung S, Fu SM. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):273–88.
134. Hartl D, Griese M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Reinhardt D, et al. A role for MCP-1/CCR2 in interstitial lung disease in children. *Respir Res. BioMed Central*; 2005 Aug 11;6(1):686–12.
135. Roels E, Krafft E, Farnir F, Holopainen S, Laurila HP, Rajamäki MM, et al. Assessment of CCL2 and CXCL8 chemokines in serum, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue samples from dogs affected with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Vet J*. 2015 Oct;206(1):75–82.
136. Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KKW, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int. Elsevier*; 2002 Oct;62(4):1160–70.
137. Nishi T, Maier CM, Hayashi T, Saito A, Chan PH. Superoxide Dismutase 1 Overexpression Reduces MCP-1 and MIP-1 α Expression after Transient Focal Cerebral Ischemia. *Journal of*

Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2005 Oct;25(10):1312–24.

138. Jo N, Wu G-S, Rao NA. Upregulation of Chemokine Expression in the Retinal Vasculature in Ischemia–Reperfusion Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci. The Association for Research in Vision and Ophthalmology*; 2003 Sep 1;44(9):4054–60.
139. Sekine Y, Yasufuku K, Heidler KM, Cummings OW, Van Rooijen N, Fujisawa T, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES are chemotactic for graft infiltrating lymphocytes during acute lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Dec;23(6):719–26.
140. Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Nov;291(5):L1018–26.
141. Krishnadasan B, Farivar AS, Naidu BV, Woolley SM, Byrne K, Fraga CH, et al. Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004 Mar;77(3):1056–62.
142. Simón Adiego C, Vara E, Gonzalez-Casaurraran G. Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011 Jan 31;41(4):933–9.
143. Urner M, Schläpfer M, Herrmann IK, Hasler M, Schimmer RR, Booy C, et al. Insight into the beneficial immunomodulatory mechanism of the sevoflurane metabolite hexafluoro-2-propanol in a rat model of endotoxaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015 Sep;181(3):468–79.
144. Yue T, Roth Z'graggen B, Blumenthal S, Neff SB, Reyes L, Booy C, et al. Postconditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells in vitro. 2008 Jan 1;31(1):118–25.
145. Voigtsberger S, Lachmann RA, Leutert AC, Schläpfer M, Booy C, Reyes L, et al. Sevoflurane ameliorates gas exchange and attenuates lung damage in experimental lipopolysaccharide-induced lung injury. 2009 Dec;111(6):1238–48.
146. Wolfs TGAM, de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, van Heurnn LWE, Oosterhof GON, et al. Apoptotic Cell Death Is Initiated During Normothermic Ischemia in Human Kidneys. *Am J Transplant. Munksgaard International Publishers*; 2005 Jan;5(1):68–75.
147. Qiu J, Shi P, Mao W, Zhao Y, Liu W, Wang Y. Effect of apoptosis in neural stem cells treated with sevoflurane. *BMC Anesthesiol. BioMed Central*; 2015;15(1):25.

148. Grünenfelder J, Miniati DN, Murata S, Falk V, Hoyt EG, Kown M, et al. Upregulation of Bcl-2 Through Caspase-3 Inhibition Ameliorates Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Cardiac Allografts. *Circulation*. American Heart Association, Inc; 2001 Sep 18;104(suppl 1):I-202–I-206.
149. Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. *Transplant Proc*. 2008 Jul;40(6):2038–41.
150. Kuida K. Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Feb;32(2):121–4.
151. Z'graggen BR, Tornic J, Müller-Edenborn B, Reyes L, Booy C, Beck-Schimmer B. Acute lung injury: apoptosis in effector and target cells of the upper and lower airway compartment. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul 9;161(2):324–31.
152. Fujinaga T, Nakamura T, Fukuse T, Chen F, Zhang J, Ueda S, et al. Isoflurane inhalation after circulatory arrest protects against warm ischemia reperfusion injury of the lungs. *Transplantation*. 2006 Nov 15;82(9):1168–74.
153. Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y, Xu Z, Knapp A, et al. The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):4025–37.
154. Wei GH, Zhang J, Liao D-Q, Li Z, Yang J, Luo N-F, et al. The common anesthetic, sevoflurane, induces apoptosis in A549 lung alveolar epithelial cells. *Mol Med Rep*. 2014 Jan;9(1):197–203.
155. Liu Y, Shi L, Liu C, Zhu G, Li H, Zhao H, et al. Effect of combination therapy of propofol and sevoflurane on MAP2K3 level and myocardial apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats. *Int J Clin Exp Med*. e-Century Publishing Corporation; 2015;8(4):6427–35.
156. Li J-T, Wang H, Li W, Wang L-F, Hou L-C, Mu J-L, et al. Anesthetic isoflurane posttreatment attenuates experimental lung injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:108928.